

TESIS DOCTORAL

**Evaluación *in vitro* del potencial citotóxico de  
mezclas de contaminantes ambientales  
presentes en aguas de uso humano.**

Memoria presentada por **José Manuel Pérez Martín** para optar al grado de Doctor  
en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid

Trabajo dirigido por la Dra. **M<sup>a</sup> José Hazen de San Juan**, Profesora Titular del área  
de Biología celular

2010





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

**M<sup>a</sup> José Hazen de San Juan**, profesora titular del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid, certifica que José Manuel Pérez Martín ha realizado el trabajo “Evaluación *in vitro* del potencial citotóxico de mezclas de contaminantes ambientales presentes en aguas de uso humano” bajo su dirección.

Madrid, septiembre de 2010

Firmado:

Dra. M<sup>a</sup> José Hazen





Esta tesis se ha realizado gracias a las siguientes fuentes de financiación:

Proyectos de Investigación:

- “Desarrollo y optimización de una estrategia de ensayos *in vitro* para la evaluación toxicológica de mezclas de contaminantes ambientales”. CICYT CTM2005-02135/TECNO.
- “Evaluación *in vitro* del potencial citotóxico de mezclas de contaminantes ambientales presentes en aguas de uso humano”. UAM-CM CCG06-UAM/AMB-0186.
- “Perfeccionamiento de una aproximación experimental *in vitro* para la evaluación de los mecanismos de acción tóxica de contaminantes ambientales”. Ministerio de Ciencia e Innovación CTM2008-00311/TECNO.

Becas y contratos:

- Ayuda de Tercer Ciclo de la UAM (octubre de 2002 – abril de 2005).
- Beca FPU-UAM (mayo de 2005 – abril de 2007).
- Contrato FPU-UAM (mayo de 2007 – enero de 2009).
- Contrato de Ayudante LOU (enero de 2009- hasta la fecha).



*“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto y pensar lo que nadie más ha pensado”.*

*Albert Szent-Györgi (1893-1986)*



## Agradecimientos



*Sí alguien piensa que una tesis doctoral la puede hacer uno solo, está muy equivocado, las ayudas que he recibido por parte de mucha gente habría que ponerlas en otras partes de este documento, pero el protocolo exige que vayan aquí. No voy a tratar de ser breve, lo voy a ser, porque por mucho que escriba sobre cada uno de los que me han acompañado en este camino me quedaré corto en el premio que se merecen.*

*A mi directora, la Dra. M<sup>a</sup> José Hazen, quiero agradecerle todo lo aprendido durante estos años y dedicarle una frase que refleja muy bien la base de sus enseñanzas: "elige a tu compañero de viaje antes que la ruta". Muchas gracias Pepa.*

*A mis compañeros de laboratorio:*

*Gracias Paloma, entraste por la puerta el mismo día que yo, y después de todos estos años no ha habido un día en el que se pueda decir que has hecho algo pensando sólo en tí. Eres la generosidad en persona, mechoncito rojo.*

*Gracias Vero, te arrastramos a la investigación y te volviste multifotónica. La culpa de este trabajo es toda tuya. ¿No había botes de residuos para tirar lo que te sobraba? Gracias.*

*Gracias Ana, porque tito Stuart necesita tu actitud y aptitud.*

*Gracias Óscar, con gente como tú es imposible no aprender a ser persona, científico y hasta parecer informático.*

*Gracias Laura, que aunque hayas llegado al grupo hace poco, ya eras parte de los que han estado ahí cuando ha hecho falta.*

*A mis compañeros de comidas y sobremesas.*

*Gracias a Ester que por fin se ha licenciado. Has hecho que ese mundo de felicidad que sólo tú ves, lo notáramos todos a ratitos.*

*Gracias a Charo y Fernando que han aguantado mis historias como si ellos no tuvieran nada que les preocupara.*

*Gracias a Cambra y Rello que aunque en la parte final del trabajo no compartimos tanto, hubo un tiempo en que éramos famosos en Psicología.*

*A mis colaboradores del hospital.*

*Gracias Lidia, ahora Dra. Daimiel. Ves como si se podía y no era imposible. Gran persona y gran científica. Gracias por invitarme a hacer un microarray, y al final una RT y un western, pero también por las agotadoras discusiones científicas y de política universitaria, o conspiraciones como te gusta llamarlas.*

*Gracias Cova, te viste arrastrada a asesorarnos y a ayudarnos con los westerns e incluso con las citometrías.*

*Gracias a Javier que nunca puso problemas para que estuviera en su laboratorio, incluso cuando secuestraba a su gente para tomar café.*

*Gracias también a Lorena, que le tocó ayudarme con parte de mis muestras. No me quiero olvidar de nadie: Miguel Ángel, Diego, María, Rebeca, Vero, Paquí, Hanna y muchos más. Gracias a todos los miembros del servicio Bioquímica-Investigación del Hospital Ramón y Cajal por hacerme sentir como parte de su grupo.*

*Todavía queda gente de la UAM por agradecer.*

*Gracias a Conchí y Montse que me asesoraron y ayudaron con algunos flecos que no están aquí, pero espero que estén "allí" en algún momento. Por supuesto a Nargisse, por fin Dra. Nejda, por todos los ratos que nos pasamos hablando de intrigas palaciegas ¡¡¡Gracias bichos!!!! No me olvido de Virginia, a la que persigo por el campus para que apunte en su agenda el pedido de última hora, mil perdones otra vez y gracias.*

*Gracias a todo el PAS departamento de Biología. Gracias a Paquí Pesado, a Adela Ferrera y a Adela Sánchez por hacernos las cosas más fáciles. También a Pilar, Miguel Ángel Fernández, Fernando y Paco que generalmente no ponen pegas cuando pido algo. No me olvido de M. Ángel Sánchez que fue una persona que siempre me ayudó cuando tuve algún problema. También gracias al personal de otras oficinas: Marta Peno y Mamen de tercer ciclo; Patricia de formación docente; Lola, Raúl, Charo e incluso Celia de Investigación.*

*Gracias a mis profesores del departamento que Biología, en especial a los de Biología celular, mi unidad, y a algunos de Genética de los que siempre tendré buen recuerdo.*

*También hay que nombrar a Sylvia Gutiérrez Erlandsson, la antigua responsable del servicio de microscopía y citometría del CNB, que hizo posible estas citometrías.*

*Por último, gracias a mi entorno personal.*

*A mis familias, directa y política, y en especial a mis chicas (Esther y Eva). Gracias Esther porque me has apoyado sin quejarte y sin preguntar el porqué de las cosas. Además creo que lo has hecho sin entender muy bien de qué iba todo esto y si merecería la pena, lo que tiene más mérito aún. Lo único que te importaba era que hiciera lo que yo quería. Espero poder devolver tanta confianza.*

*También gracias a Iván, ese central del 3.14 que daba miedo, un figura. También me gustaría recordar a Iñaki que nos dejó, pero que estará siempre con nosotros.*







## Índice



Abreviaturas .....	i - ii
Índice de figuras .....	iii-iv
Índice de tablas .....	v
Resumen .....	viii
<b>Introducción .....</b>	<b>1 – 17</b>
<b>Hipótesis de partida y objetivos .....</b>	<b>18</b>
<b>Material y Métodos .....</b>	<b>19-50</b>
1. Compuestos seleccionados para el estudio .....	19
2. Cultivos celulares .....	19-22
2.1. Línea celular .....	19-20
2.2. Infraestructura y material de cultivos .....	20
2.3. Mantenimiento de los cultivos.....	21
2.4. Condiciones de tratamiento .....	22
3. Diseño del protocolo experimental .....	22-24
4. Metodología .....	25-47
4.1. Viabilidad celular .....	25-27
4.2. Análisis de la proliferación .....	28-30
4.3. Morfología celular .....	30-31
4.4. Marcadores de daño subcelular .....	31-34
4.5. Análisis específicos de daño al ADN .....	35-38
4.6. Estrés oxidativo .....	38-39
4.7. Estudios de adhesión celular .....	39
4.8. Análisis de la expresión génica .....	39-45
4.9. Western Blot .....	45-47
5. Microscopía .....	48
6. Análisis estadísticos .....	48-49
7. Análisis matemático del efecto combinado .....	50

<b>Resultados .....</b>	<b>51-96</b>
1. Evaluación de citotoxicidad individual .....	51-53
2. Evaluación de citotoxicidad combinada .....	53-56
3. Determinación del mecanismo de acción tóxica .....	56-80
3.1. Estudio del mecanismo de acción de <i>Mix 300</i> .....	56-66
3.2. Estudio del mecanismo de acción de <i>Mix 100</i> .....	66-71
3.3. Estudio del efecto tóxico retardado .....	72-74
3.4. Aproximación -ómica del efecto combinado .....	75-80
4. Análisis matemático del efecto combinado .....	81-96
4.1. Análisis del efecto combinado de citotoxicidad .....	81-86
4.2. Análisis de parámetros de relevancia mecanística .....	86-91
4.3. Análisis matemático del efecto combinado retardado .....	92
4.4. Parámetros no cuantitativos .....	93-94
4.5. Predecibilidad de los efectos tóxicos .....	94-96
<b>Discusión .....</b>	<b>97-114</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>115</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>116-139</b>







## ABREVIATURAS

**8-OHdG.** 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.

**ADI.** Ingesta diaria aceptable.

**ADN.** Ácido desoxirribonucleico.

**ADNc.** Ácido desoxirribonucleico complementario.

**ANOVA.** Análisis de la varianza.

**ARN.** Ácido ribonucleico.

**ATCC.** Colección americana de cultivos tipo.

**ATSDR.** Agencia de registro de sustancias tóxicas y enfermedades.

**BHA.** Butilhidroxianisol.

**BSA.** Albúmina de suero bovino.

**CAS.** Servicio de resumen de compuestos químicos.

**CCNs.** Ciclinas.

**CDK.** Kinasas dependientes de ciclinas.

**CIREP.** Panel de expertos para la revisión de ingredientes cosméticos.

**CKI.** Inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas.

**C.N.C.** (Modelo de) Correlación Negativa Completa.

**CPC.** Condensación Prematura de la Cromatina.

**C.P.C.** (Modelo de) Correlación Positiva Completa.

**CPT.** Contenido de Proteína Total.

**DAB.** Diaminobencidina.

**DCF.** Diclorofluoresceína oxidada.

**DCFH.** Diclorofluoresceína reducida.

**DCFH-DA.** 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato.

**DEPC.** Dietilpirocarbonato.

**DHE.** Dihidroetidina.

**DMEM.** Medio de Eagle modificado por Dulbecco.

**DMSO.** Dimetilsulfóxido.

**DNAsa.** Desoxirribonucleasa.

**dNTP.** DesoxiNucleótidos Trifosfato.

**DRV.** Disminución regulada de volumen.

**DSB.** Rotura de doble cadena.

**DTT.** Di-Tio-Tritol.

**ECOPA.** Plataforma europea de consenso para alternativas.

**ECVAM.** Centro europeo para la validación de métodos alternativos.

**ECHA.** Agencia europea de sustancias y preparados químicos.

**EDTA.** Ácido etilendiaminotetraacético.

**EE.UU.** Estados Unidos (de Norteamérica).

**EFSA.** Autoridad europea de seguridad alimentaria.

**EMA.** Agencia europea de medicamentos.

**EPA.** Agencia de Protección Ambiental.

**ERO.** Especies Reactivas de Oxígeno.

**FDA.** Agencia de alimentos y drogas.

**FET.** Factor de Equivalencia Tóxica.

**FITC.** Conjugado con isotiocianato de fluoresceína.

**GMPC.** Guanosin monofosfato cíclico.

**GRAS.** Generalmente reconocido como seguro.

**HR.** Recombinación homóloga.

**IARC.** Agencia internacional para la investigación del cáncer.

**IC.** Índice de Combinación.

**ICCVAM.** Comité de coordinación entre agencias para la validación de métodos alternativos.

**ILSI.** Instituto Internacional de Ciencias de la Vida.

**ISO.** Organización Internacional para la estandarización.

**JECFA.** Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios

**LOEC.** Concentración de menor efecto observado.

**MANOVA.** Análisis de la varianza multifactorial.

**MCCS.** Medio Completo Con Suero.

**MCSS.** Medio Completo Sin Suero.

**MTT.** Reducción del bromuro del 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

**NHEJ.** Reunión de extremos no homólogos.

**NIEHS.** Instituto Nacional de Ciencias de Salud Ambiental.

**NOEC.** Concentración sin efecto observado.

**OCDE.** Organización para la cooperación y el desarrollo económico.

**P.A.** Principio de Aditividad (de Loewe).

**PBPD/PBPK.** Fisiológicamente basado en la farmacodinámica/farmacocinética.

**PBS.** Tampón fosfato salino.

**PCA.** Análisis de componentes principales.

**PLS.** Proyección sobre estructuras latentes.

**PPB.** Propilparabeno.

**PPCP.** Fármacos y productos de cuidado personal.

**RCK.** Regulación de la conductancia del ion potasio.

**REACH.** Registro, evaluación y autorización de sustancias químicas.

**REMA.** Red Española de Métodos Alternativos.

**RN.** Captura de rojo neutro.

**RT-qPCR.** Reacción en cadena de la polimerasa en modo cuantitativo a tiempo real.

**S.C.** (Modelo) Sin Correlación.

**SOT.** Sociedad de Toxicología de Estados Unidos de Norteamérica.

**TBS.** Tampón tris salino.

**TEMED.** N,N,N,N'-tetrametilnediamina.

**TRITC.** Conjugado con isotiocianato de tetrametilrodamina.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	1
Figura 2 .....	3
Figura 3 .....	5
Figura 4 .....	8
Figura 5 .....	9
Figura 6 .....	13
Figura 7 .....	20
Figura 8 .....	23
Figura 9 .....	51
Figura 10 .....	52
Figura 11 .....	52
Figura 12 .....	53
Figura 13 .....	54
Figura 14 .....	56
Figura 15 .....	57
Figura 16 .....	58
Figura 17 .....	58
Figura 18 .....	59
Figura 19 .....	60
Figura 20 .....	60
Figura 21 .....	61
Figura 22 .....	62
Figura 23 .....	62
Figura 24 .....	63
Figura 25 .....	63
Figura 26 .....	64
Figura 27 .....	65
Figura 28 .....	65
Figura 29 .....	66
Figura 30 .....	67
Figura 31 .....	67
Figura 32 .....	68
Figura 33 .....	69
Figura 34 .....	69
Figura 35 .....	70
Figura 36 .....	71

Figura 37 .....	72
Figura 38 .....	73
Figura 39 .....	75
Figura 40 .....	76
Figura 41 .....	77
Figura 42 .....	79
Figura 43 .....	80
Figura 44 .....	81
Figura 45 .....	82
Figura 46 .....	83
Figura 47 .....	85
Figura 48 .....	85
Figura 49 .....	87
Figura 50 .....	87
Figura 51 .....	88
Figura 52 .....	89
Figura 53 .....	90
Figura 54 .....	90
Figura 55 .....	92
Figura 56 .....	93
Figura 57 .....	94

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 .....	6
Tabla 2 .....	19
Tabla 3 .....	22
Tabla 4 .....	34
Tabla 5 .....	45
Tabla 6 .....	46
Tabla 7 .....	46
Tabla 8 .....	51
Tabla 9 .....	53
Tabla 10 .....	53
Tabla 11 .....	54
Tabla 12 .....	54
Tabla 13 .....	55
Tabla 14 .....	61
Tabla 15 .....	73
Tabla 16 .....	74
Tabla 17 .....	74
Tabla 18 .....	78
Tabla 19 .....	84
Tabla 20 .....	86
Tabla 21 .....	91
Tabla 22 .....	95
Tabla 23 .....	96



## RESUMEN

La presencia en el medio ambiente de compuestos químicos del grupo conocido como Fármacos y Productos de Cuidado Personal (PPCPs), se ha incrementado sustancialmente en los últimos años. Estas sustancias presentan generalmente mecanismos de acción tóxica poco definidos y por lo tanto sus efectos sobre la salud humana y el medio ambiente suelen ser controvertidos. No obstante, no se descartan posibles reacciones tóxicas debidas a la exposición combinada de PPCPs, ya que estos compuestos aparecen formando mezclas de composición desconocida, lo que ha generado una gran preocupación. Debido a esto, han surgido diferentes propuestas que desde la comunidad científica y las agencias reguladoras que solicitan el abordaje de la evaluación toxicológica del efecto combinado.

Los primeros estudios del efecto combinado fueron de carácter empírico y se llevaron a cabo a finales del s. XIX. Posteriormente comenzó una carrera para desarrollar modelos matemáticos predictivos que a día de hoy todavía no son infalibles. Actualmente se intenta mejorar la predicción, incorporando datos de tipo mecanístico en la evaluación de los efectos tóxicos de mezclas químicas.

Por este motivo, nos planteamos evaluar una mezcla binaria compuesta por butilhidroxianisol (BHA) y propilparabeno (PPB), dos aditivos de uso autorizado que han sido detectados en el medio ambiente y presentan efectos controvertidos sobre la salud humana. Para ello seleccionamos en base a nuestra experiencia previa un modelo experimental representado por las células Vero, fibroblastos de riñón de mono verde africano (*Chlorocebus aethiops*), de elevada sensibilidad en estudios de toxicología y con características idóneas para el análisis del mecanismo de acción de compuestos químicos. El diseño experimental incluye una batería de ensayos constituida por una serie de biomarcadores bioquímicos y morfológicos complementarios entre sí, cuya utilidad hemos demostrado previamente.

El estudio nos ha permitido determinar *in vitro* el mecanismo de acción tóxica de ambos aditivos de forma individual, así como de sus mezclas binarias. Los resultados mostraron que las combinaciones de BHA y PPB inducen importantes alteraciones funcionales causadas por desequilibrio osmótico, que van asociadas con desajustes en la progresión del ciclo celular, incrementos en la ploidía, lesiones en el ADN por daño oxidativo y muerte celular. Asimismo la retirada de los tratamientos experimentales provocó en las células Vero una respuesta de toxicidad retardada que incluye desajustes en el ciclo celular junto con incrementos de la proliferación.

Por otra parte, el empleo de modelos matemáticos para el análisis de la predicción del efecto combinado nos ha permitido demostrar que la estima cuantitativa de las respuestas celulares esperadas, generalmente no se ajusta con precisión al efecto observado. Sin embargo, la toxicidad inducida por las mezclas puede predecirse cualitativamente una vez establecidos los mecanismos de acción de los compuestos individuales.





## Introducción



El auge de la industria química durante la segunda mitad del siglo XX ha provocado que los organismos vivos estemos expuestos hoy en día a más de 100.000 compuestos químicos de uso comercial. En la Unión Europea se introducen anualmente unos 2.000 xenobióticos nuevos y, según el Inventario Europeo de Sustancias Químicas Existentes, se utilizan diariamente entre 30.000 y 70.000 (Schwarzenbach y col., 2006; EINECS, 2010), de las que más del 20 % del total carece de control y evaluación (Allanou y col., 1999, 2003a, b). La figura 1 resume el informe publicado por la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos en 1994, que indicaba que sólo el 10 % de los pesticidas, el 2 % de los cosméticos, el 18 % de los fármacos y el 5 % de los aditivos alimentarios estaban completamente evaluados.

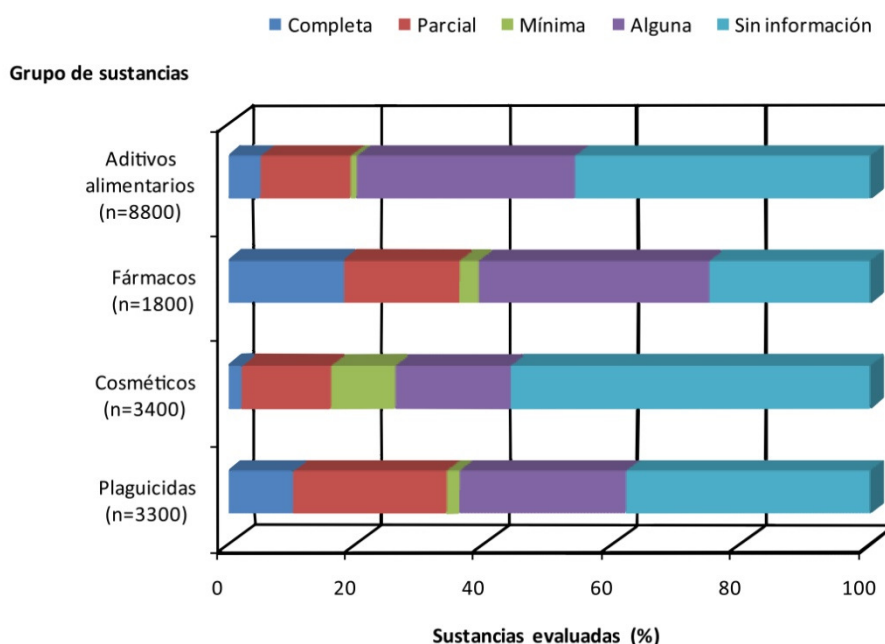


Figura 1. Nivel de información existente sobre la evaluación de sustancias químicas registradas, agrupadas por uso industrial. Modificado del informe de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos (1994).

En la década de 1950, la presencia de compuestos químicos de origen industrial, agrícola y ganadero en la atmósfera, en aguas superficiales y en suelos suscitó una gran preocupación. Sin embargo, el verdadero detonante de la “revolución verde”, que se produjo diez años más tarde, fue el problema de salud que generó la exposición a pesticidas como el DDT (dicloro-difenil-tricloroetano). Aunque actualmente se intentan producir biocidas más selectivos e inocuos para seres vivos no diana, esto resulta extremadamente complicado (Forbes y col., 2009). Los contaminantes generalmente son sustancias liposolubles que presentan gran capacidad de bioacumulación. El tejido adiposo de los animales suele ser un gran reservorio de sustancias hidrófobas ingeridas de otros organismos de niveles tróficos inferiores, por este motivo la acumulación se produce de manera más rápida en individuos situados en las cúspides de las pirámides alimentarias (Fisk y col., 2001; Hop y col., 2002; Wang y Needham, 2007). Esto explica que en la sangre y el tejido adiposo de osos polares, cetáceos, focas, pingüinos, aves marinas e incluso poblaciones humanas se hayan detectado sustancias a las que nunca han estado directamente expuestos (Van Oostdam y col., 2004; Braune y col., 2005; Krüger y col., 2008).

La bioacumulación de xenobióticos en el organismo es preocupante, ya que ha sido relacionada con patologías que afectan a la salud humana. Tanto es así que recientemente, se está empezando a asociar la contaminación ambiental con dolencias

de tipo respiratorio como la bronquitis (Sunyer y col., 2006), inmunodepresión severa y alergias (Edwards y Myers, 2007; Jalava y col., 2007), así como otras afecciones con peor pronóstico. Tal es el caso de las patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y la de Alzheimer, que han sido relacionadas con la exposición a pesticidas (Ascherio y col., 2006; Brown y col., 2006) y metales (Rodella y col., 2008; Wu y col., 2008) respectivamente. Asimismo, en los últimos años, se han descrito casos de fatiga crónica y reacciones de hipersensibilidad a sustancias químicas que cursan tras la exposición continua o puntual a sustancias de uso cotidiano: productos de limpieza, pesticidas, pintura fresca, materiales de construcción, perfumes y productos plásticos, entre otros (Caress y Steinemann, 2004; Fenández-Solà y col., 2005; Grinton, 2005).

De la misma manera, diversos compuestos de uso cotidiano como plastificantes, pesticidas, piroretardantes, fármacos y aditivos autorizados en cosméticos y alimentos han sido asociados con alteraciones del sistema endocrino y del aparato reproductor de diferentes grupos taxonómicos, así como con la inducción de distintos tipos de cáncer en humanos (Irigaray y col., 2007). Los alteradores endocrinos (*endocrine disruptors*) son compuestos tóxicos para la reproducción que mimetizan a las hormonas sexuales provocando efectos indeseados en los organismos vivos, como cambios en las proporciones de sexos en poblaciones de peces (Weisskopf y col., 2003) e incrementos en las frecuencias de hermafroditas en las poblaciones de invertebrados (Quintela y col., 2002; Gómez-Ariza y col., 2006), peces (Solé y col., 2003; Martin-Skilton y col., 2006) e incluso en las de osos polares (Wiig y col., 1998). Además, en algunas ocasiones se han visto implicados en procesos de carcinogénesis debido a su capacidad para inducir proliferación celular descontrolada en diferentes tejidos (Jobling y col., 1995; Kortenkamp, 2006). En este sentido la teoría de la carcinogénesis multifásica (promoción, iniciación y progresión) también cobra un enfoque multifactorial poniendo más en relieve la interacción individuo-ambiente. Por lo tanto, teniendo en cuenta que cada vez son más las enfermedades que parecen tener relación con los problemas de contaminación ambiental (Edwards y Myers, 2007), queda patente que la solución pasa por producir y comercializar sustancias seguras que no produzcan efectos indeseados sobre los seres humanos, ni sobre los organismos del ecosistema. Actualmente los sistemas legales que regulan la seguridad química de compuestos industriales en Europa están centralizados en la normativa REACH (*Registration, Evaluation, and Authorization of Chemicals*), que exige la evaluación de sustancias y preparados químicos que se comercializan o producen en unas cantidades determinadas (EC, 2006).

Estudios científicos de la última década del siglo pasado, han puesto de manifiesto la existencia de un nuevo grupo de contaminantes que hasta ese momento había pasado desapercibido, los Fármacos y Productos de Cuidado Personal (PPCP en inglés *Pharmaceutical and Personal Care Products*) (Ternes, 1998; Daughton y Ternes, 1999). La determinación de estos compuestos en aguas superficiales en el año 1998 supuso un hito histórico en la toxicología analítica, aunque Hignite y Azarnoff en (1977) ya habían indicado la presencia de salicilatos en el río Big Blue (EE. UU.). Los PPCP se presentan en concentraciones muy bajas que oscilan entre ng/L y µg/L, aunque en casos extremos alcanzan niveles de mg/L (Daughton y Ternes, 1999; Jjemba, 2006; Schwarzenbach y col., 2006). Tanto los fármacos y sus metabolitos, como los productos cosméticos o de aseo personal son excretados o desechados por las tuberías de los edificios como excedente de uso o consumo y vertidos a cursos de agua destinados a la depuración, en el mejor de los casos.

La depuración convencional de aguas contaminadas no es un proceso de elevada eficacia. Como se ha determinado en varios trabajos y a pesar de los exhaustivos y estrictos controles de calidad que se realizan sobre el agua de uso humano, se han encontrado elevadas concentraciones de PPCP en varios estados de la

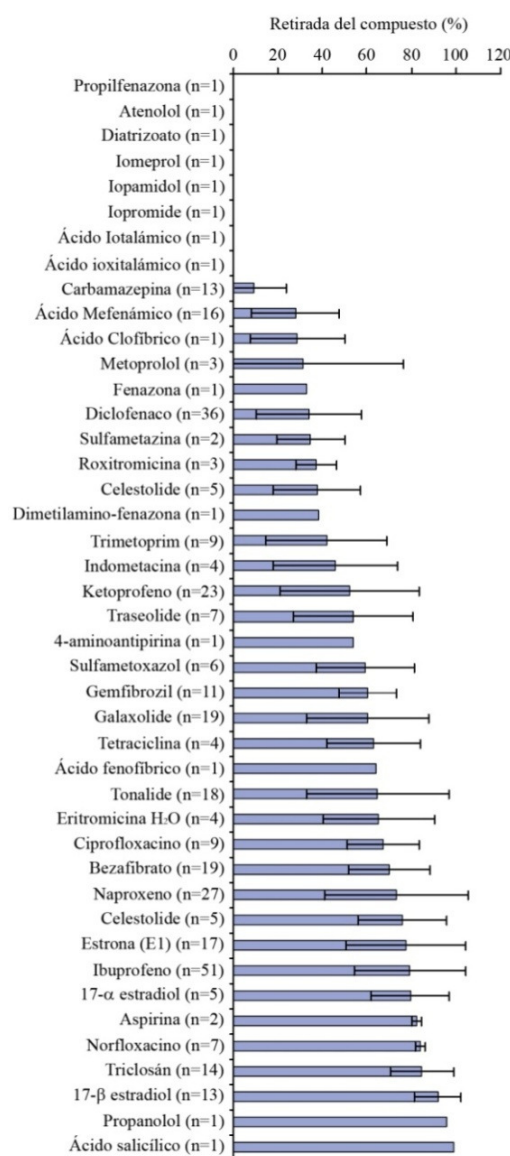


Figura 2. Tasas de eliminación de fármacos y cosméticos en una planta de tratamiento de aguas residuales una vez finalizados los procesos de depuración convencionales (Modificado de Miège y col., 2008).

Unión Europea como Alemania (Heberer, 2002a, b), Reino Unido (Thomas y Hilton, 2004; Bound y Voulvoulis, 2005), Francia, Italia, Grecia, Suecia (Andreozzi y col., 2003) y España (Carballa y col., 2007), así como en Estados Unidos (Boyd y col., 2004; Standley y col., 2008) y Canadá (Brun y col., 2006). En muchos de estos estudios se muestran además resultados de los análisis realizados en plantas depuradoras antes y después del proceso de tratamiento, concluyéndose que los métodos convencionales de eliminación de contaminantes no son igual de eficaces para todos los compuestos (figura 2) e incluso en algunos casos tiende a la acumulación de los mismos (Miège y col., 2008). Por lo tanto, la reutilización de agua puede tener graves consecuencias para la salud por la ineficiencia del proceso, además de por otros problemas asociados con los tratamientos químicos que ayudan a la potabilización, cuya seguridad está siendo cuestionada (Calderon, 2000; Simmons y col., 2002).

Por este motivo, se han desarrollado nuevas técnicas de retirada de residuos como la ozonación (Andreozzi y col., 2002), la irradiación con luz ultravioleta (Andreozzi y col., 2003), la oxidación (Huber y col., 2005), la nanofiltración (Nghiem y col., 2005) y la biodegradación (Joss y col., 2005) entre otras, aunque por el momento no son de uso generalizado.

Por otro lado, se trabaja en la retirada controlada de fármacos caducados, plásticos, radiografías, etc., evitando así que se eliminen como basura convencional y entren en el ecosistema.

En la mayor parte de los casos, los PPCP no son fácilmente degradables o presentan tasas de eliminación lentas, ya que han sido diseñados para tener una larga vida media y, en el caso de los fármacos, para ser degradados por rutas metabólicas muy concretas. Estos compuestos pueden encontrar en el medio ambiente vías alternativas de degradación abiótica como la fotólisis y la hidrólisis (Andreozzi y col., 2003; Cunningham y col., 2006). En muchas ocasiones, los PPCP tienen propiedades físico-químicas que les permiten acumularse en los tejidos de los organismos vivos, desconociéndose hasta la fecha los posibles efectos nocivos para la salud ambiental (Raab y col., 2007, 2008). Tanto es así que, a pesar de su empleo generalizado, en

muchos casos no están definidos ni los mecanismos de acción tóxica ni las rutas de degradación y transformación en los ecosistemas, por lo que se desconocen los efectos que pueden causar sobre la salud humana y el medio ambiente.

A pesar de que las concentraciones de las sustancias químicas detectadas en el agua no son generalmente muy elevadas, su presencia en el medio ambiente, formando mezclas de composición y proporciones desconocidas, ha alertado a los gobiernos y agencias reguladoras, debido a las consecuencias que pueden aparecer a largo plazo. Las combinaciones de composición desconocida se denominan mezclas complejas, en contraposición a las mezclas simples, cuyos constituyentes son menos de diez y de dosis conocidas (Groten y col., 2001). Actualmente, la principal dificultad radica en prever las combinaciones posibles a las que podemos estar expuestos, no sólo en cuanto a dosis, sino también en cuanto a la variedad de agentes que las componen (Schwarzenbach y col., 2006; Teuschler, 2007). El reglamento REACH no incluye los PPCP y por lo tanto, la contaminación ambiental derivada de la presencia de fármacos y productos de cuidado personal y de sus posibles mezclas en el medio ambiente, no son de valoración obligatoria. A pesar de ello, es evidente que las propiedades tóxicas emergentes que surgen de las combinaciones de estos compuestos deben ser evaluadas (Daughton y Ternes, 1999; Heberer, 2002a, b; Cleuvers, 2003, 2004). Recientemente, se ha sugerido un abordaje del problema, que consiste en determinar qué compuestos pueden aumentar los daños producidos por otros cuando se presentan en combinación y de esta manera facilitar la elección de compuestos que deban ser prioritariamente eliminados mediante el proceso de depuración (Zuccato y col., 2005; Schwarzenbach y col., 2006).

Históricamente, el estudio de la toxicidad de los contaminantes ambientales se ha realizado mediante ensayos de evaluación de compuestos individuales, de los cuales se extraen resultados muy valiosos (Monosson, 2005). Sin embargo, el análisis de los efectos de mezclas de compuestos químicos es una aproximación más realista que el análisis individual para abordar el problema de la contaminación ambiental, aunque la determinación de la interacción entre sustancias no es sencilla. En la última década, las investigaciones en el campo de la toxicología experimental, ambiental y la ecotoxicología han abierto un nuevo frente de estudio: el análisis de los efectos tóxicos de mezclas de contaminantes ambientales (Kortenkamp, 2007).

Como se muestra en la figura 3, el estudio de mezclas de compuestos químicos se inicia en la segunda mitad del siglo XIX, siendo Fraser quien llevó a cabo el primer trabajo de efecto combinado, observando que la letalidad de la fisostigmina se podía prevenir en presencia de atropina. Dicho resultado tardó dos años en ser aceptado por la Real Sociedad de Edimburgo (Fraser, 1871). El análisis de los efectos producidos por la combinación de fármacos desencadenó el interés por conocer lo que eran capaces de hacer dos sustancias juntas, en comparación con lo que hacían por separado. Posteriormente, ya bien entrado el siglo XX muchos han sido los resultados obtenidos en este campo (Berenbaum, 1989; Greco y col., 1995; Chou, 2006). Sin embargo, casi un siglo y medio después, sigue existiendo controversia tanto en la terminología, como en el diseño experimental y sobre todo limitaciones en la predicción, ya que aún no se ha propuesto un modelo de estima del efecto combinado infalible.

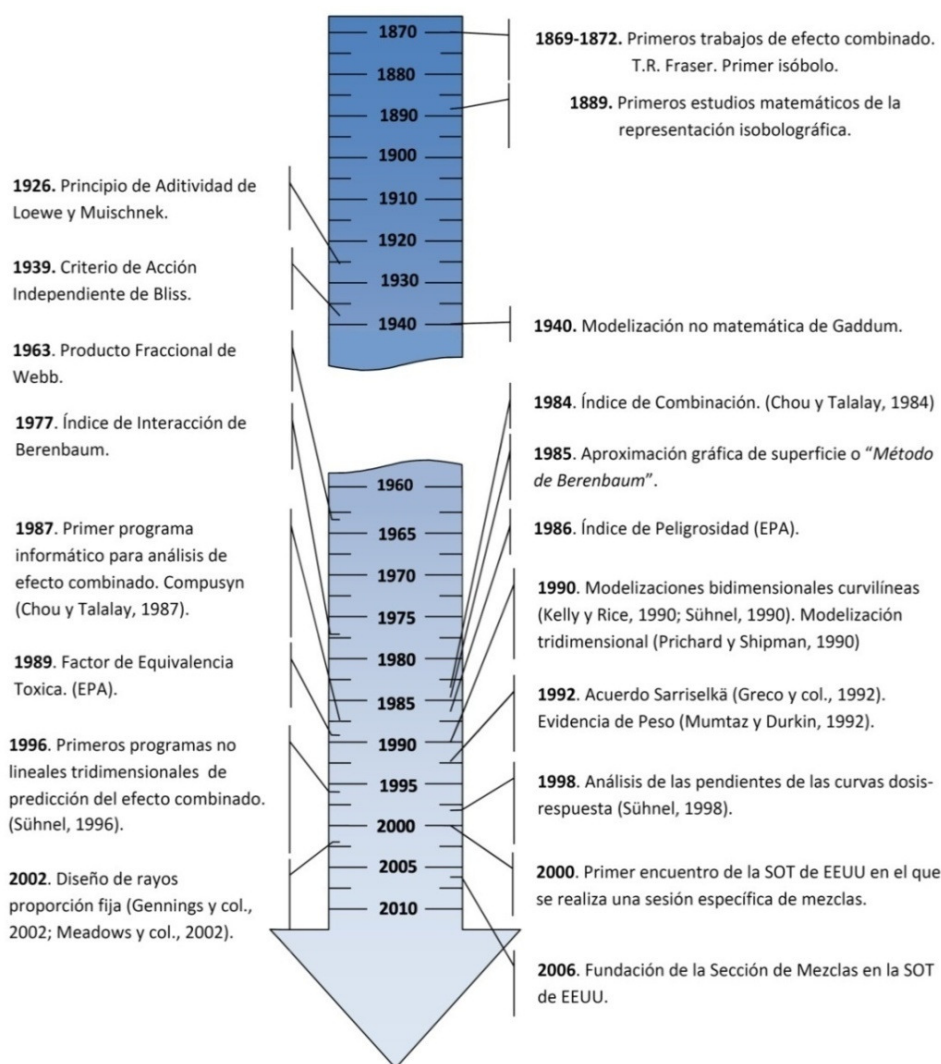


Figura 3. Eje cronológico de los hitos históricos más relevantes en el estudio del efecto combinado.

En cuanto a la terminología, el estudio de mezclas desde sus orígenes, emplea tres categorías para clasificar los efectos combinados: **Antagonismo**, **Interacción cero** o **Aditividad** y **Sinergia**, aunque no existe un consenso unánime en la aplicación de estos términos.

**Antagonismo** (del griego *ανταγωνισμός*) para la Real Academia Española de la Lengua se entiende en su acepción biológica como *"interacción entre organismos o sustancias que causa pérdida de actividad de uno de ellos, como la acción de los antibióticos frente a las bacterias"*.

**Interacción cero o Aditividad**, en toxicología de mezclas, se entiende como el efecto que no difiere del esperado, asumiendo que éste es la suma de los efectos individuales observados.

**Sinergia** que también procede del griego *συνεργωα*, que significa cooperación, se define como *"acción de dos o más causas cuyo efecto es superior a la suma de los efectos individuales"* o como *"concurso activo y concertado de varios órganos para realizar una función"*.

A pesar de que los términos antagonismo e interacción cero no han presentado demasiados problemas, el concepto de sinergia ha sido dividido en multitud de subtipos que complican el manejo de la terminología. En Toxicología, la definición de sinergia puede presentar muchos matices, sin embargo se ha definido como “*el efecto biológico combinado de dos o más sustancias igual o mayor que la suma simple de los efectos propios de cada agente*” (Repetto y col., 1995), o “*efecto mucho mayor que la suma de los efectos de cada agente administrado solo*” (Klaassen y Watkins III, 2001). Aunque pueda interpretarse esto como una sencilla manera de definir los casos que nos podemos encontrar en la naturaleza tras la exposición combinada, no es así. En los años ochenta del siglo XX, se iniciaron discusiones al respecto debido a que la terminología presentaba y actualmente sigue presentando, multitud de definiciones innecesarias y/o redundantes, que la hacen extremadamente compleja de manejar, como los casos de potenciación, adición y multiplicación entre otros (Berenbaum, 1985, 1989; Greco y col., 1992, 1995). Estos términos tienen su origen en trabajos de algunos autores que pretenden precisar más en sus observaciones y ser más minuciosos en sus descripciones. Tanto es así, que Goldin y Mantel (1957) publicaron una revisión dando siete definiciones diferentes para la sinergia. Así por ejemplo, **potenciación** se emplea en casos de sinergia en los que uno de los compuestos por separado no presenta ningún efecto ( $0 + 4 = 10$ ). La **multiplicación** es una definición que se aplica en los casos en los que la alteración observada a esa dosis se ajusta bien al producto matemático de los daños producidos por los compuestos individuales. Sin embargo, el caso más evidente es el del concepto **adición** ya que, si bien se emplea como caso particular de sinergia por algunos autores, es un término empleado para definir la no interacción en base a modelos matemáticos que definen el efecto combinado nulo como la suma de los efectos individuales (Berenbaum, 1989).

Con el fin de sentar las bases terminológicas, se creó un glosario durante la “5ª Conferencia Internacional sobre el Efecto Combinado de Factores Ambientales”, celebrada en septiembre de 1992 en Finlandia, que se denominó “**Acuerdo Sarriselkä**” (tabla 1). El consenso alcanzado por científicos procedentes de especialidades como la Farmacología, la Toxicología y la Biometría, unificó por primera vez las visiones tan dispares de la naturaleza que tienen las diferentes áreas que confluyen en el estudio del efecto combinado (Greco y col., 1992).

Efecto de la combinación	Nº de compuestos individuales que producen efecto			
	Ambos (Loewe)	Ambos (Bliss)	Sólo uno	Ninguno
<b>Mayor de lo predicho</b>	Sinergia de Loewe	Sinergia de Bliss	Sinergia	Coalismo
<b>Igual a lo predicho</b>	Aditividad de Loewe	Independencia de Bliss	Inertismo	Inertismo
<b>Menor de lo predicho</b>	Antagonismo de Loewe	Antagonismo de Bliss	Antagonismo	-

Tabla 1. Terminología consensuada tras el Acuerdo Sarriselkä en 1992 (tomada de Greco y col., 1992).

El empleo de los términos “*de Loewe*” o “*de Bliss*” pretende enfatizar el origen histórico de los modelos de estima citando los nombres de los autores que los definieron, sin darle importancia a la connotación mecanística que subyace en estos términos (Greco y col., 1992), ya que siempre se ha asociado a Loewe con predicciones de mezclas de compuestos con la misma diana de acción y a Bliss con mecanismos de toxicidad diferentes (Greco y col., 1992; Goldoni y Johansson, 2007). Por otro lado y a



pesar de esta búsqueda de consenso terminológico desde diversas áreas de investigación, se sigue empleando actualmente el término potenciación. En cambio, inertismo no ha sido usado en estudios de mezclas, y los únicos autores en utilizar el concepto de coalismo, han sido Peterson y Novick (2007).

Es evidente que las disquisiciones terminológicas son un problema complicado de abordar, sin embargo la mayor dificultad y el interés en el estudio del efecto combinado radica en la modelización del efecto esperado. En algunos casos, el efecto que produce una mezcla es diferente al que producen sus componentes de manera individual. Sin embargo, tanto las definiciones no científicas como las que proceden de la Toxicología, dicen que el efecto combinado es aquel “efecto diferente” del predicho como “efecto no interactivo” al que se le denomina interacción cero o aditividad. De modo que la base del efecto combinado radica en la predicción, ya que un efecto sinérgico es aquel que resulta ser mayor de lo esperado y uno antagónico es el que resulta ser menor de lo esperado. Debe quedar claro que si tuviésemos una herramienta matemática tremendamente precisa, todas nuestras observaciones serían predecibles y no tendríamos resultados calificables ni de sinérgicos, ni de antagónicos. Actualmente carecemos de modelos infalibles y tras más de un siglo de estudios, podemos emplear diferentes métodos sencillos, sólo aplicables en circunstancias muy estrictas y con diseños experimentales concretos, o funciones algebraicas menos restrictivas en su utilización, pero extremadamente complejas de resolver (Groten y col., 2001; Gennings y col., 2005; Chou, 2006; Goldoni y Johansson, 2007).

En los estudios científicos, el empleo de modelos matemáticos y análisis estadísticos son herramientas fundamentales para alcanzar conclusiones que sean aceptadas tras obtener resultados (Cobo y col., 2007; Spina, 2007). Sin embargo, existen circunstancias en las cuales el desarrollo de métodos apropiados es muy complejo y de difícil aplicación. Por ello y a pesar de que se sigue trabajando a este respecto, en multitud de ocasiones se determinan los efectos de las mezclas sin que se realice el pertinente ajuste matemático (Berenbaum, 1989). En esta faceta destacó Gaddum (1940) que desarrolló un análisis que no se basaba en el cálculo de predicciones y no necesitaba conocer el mecanismo de acción de los compuestos. Este modelo consiste en comparar los efectos de la mezcla con los de los compuestos por separado. Sin embargo y a pesar de que el modelo no tiene dificultad en la práctica, ha carecido de interés para los principales estudiosos del efecto combinado, debido a que no utiliza el principio de aditividad en su fundamento.

Los primeros análisis de efecto combinado de mezclas de agentes químicos fueron realizados en 1871 por Thomas R. Fraser que representó la exposición con un gráfico, denominado isoblograma (figura 4). En él se describía una línea donde, a un lado de la curva el efecto antagónico de la atropina sobre la fisostigmina desaparecía y al otro surgía (Fraser, 1871).

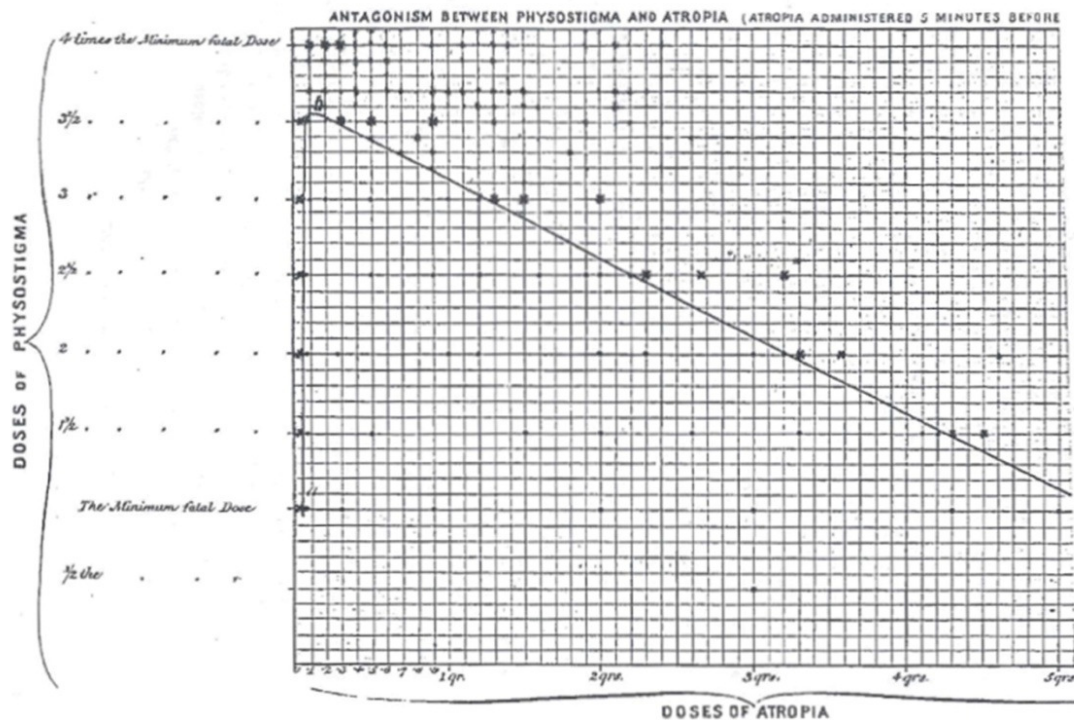
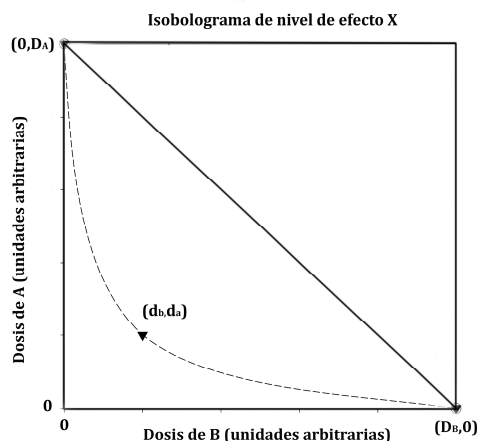


Figura 4. Isoblograma tomado de Fraser (1871) "An experimental research on the antagonism between the actions of physostigma and atropia". Proceedings of Royal Society of Edinburgh 7: 506-511.

Es evidente que este sistema gráfico presentaba grandes limitaciones, sin ir más lejos, era un mero descriptor de resultados que sólo permitía el estudio de mezclas binarias, siendo imposible predecir los efectos esperados. Los trabajos posteriores del propio Fraser (1872) y de diversos autores (Henle, 1889; Frei, 1913) intentaron optimizar el método gráfico y crear un isóbolo más adecuado para la predicción. Finalmente, Loewe y Muischnek (1926) desarrollaron la base matemática que subyacía al método isobolográfico, el Principio de Aditividad. A partir de este momento la representación gráfica para el estudio de mezclas (figura 5) seguiría los siguientes pasos:

1. Se representan sobre los ejes de coordenadas las dosis equitóxicas ( $D_B$ , 0) y (0,  $D_A$ ) de dos compuestos, unidos por una línea teórica de isoeffecto (isóbolo).
2. Se sitúa en el eje cartesiano el punto de coordenadas ( $d_b$ ,  $d_a$ ) que representa las dosis individuales presentes en la mezcla que produce el mismo efecto que  $D_A$  y  $D_B$ .
3. Si el punto queda por encima de la línea del isóbolo se trata de un efecto antagónico. Si por el contrario queda por debajo, se trata de sinergia y si coincide con la línea, el efecto es aditivo.

Por otra parte, Loewe y Muischnek desarrollaron la ecuación del Principio de Aditividad, que está relacionada con el isoblograma. La fórmula representa las concentraciones o las dosis de dos agentes ( $d_A$  y  $d_B$ ) químicos o físicos que en combinación producen un efecto determinado y las concentraciones o dosis de cada agente por separado ( $D_A$ ,  $D_B$ ) que inducen el mismo efecto. Si el valor de la interacción ( $I$ ) fuera superior a 1, hablaríamos de antagonismo y por el contrario, resultados inferiores a 1 serían casos de sinergia. Por último puede ser que el resultado que se obtenga sea 1, en ese caso podemos decir que ambos compuestos no interaccionan.



$$I = (d_a/D_A) + (d_b/D_B)$$

Figura 5. Diseño de un isoblograma y ecuación del Principio de Aditividad de Loewe y Muischnek (1926).

sean indistinguibles en la cuantificación del efecto estudiado (Borgert, 2007; Teuschler, 2007). Por lo tanto, para poder llevar a cabo el análisis, los compuestos deben tener el mismo modo de acción y sólo pueden diferir en su potencia.

A pesar de estas limitaciones y de que no se debe aplicar el modelo cuando se violan los supuestos matemáticos sobre los que se sustenta la base teórica del isócolo (Berenbaum, 1989), el modelo de aditividad de Loewe presenta resultados muy válidos, por lo que actualmente se sigue utilizando en sus múltiples variantes (EPA, 2000; Kortenkamp, 2007; Cedergreen y col., 2008). Sin embargo, a lo largo de la historia se han publicado multitud de trabajos en los que se aplicó el Principio de Aditividad de Loewe y se obtuvieron resultados contradictorios y/o erróneos (Berenbaum, 1989). Recientemente se han realizado revisiones de estudios publicados sobre predicción de efecto combinado con diferentes modelos matemáticos y se observan resultados muy variables en función de la herramienta de estima que se aplique y de las dosis que se empleen (Hertzberg y MacDonell, 2002; Cedergreen y col., 2008). Los estudios llevados a cabo con isóbolos se han ido refinando hasta el punto de que existen autores que emplean intervalos de confianza o representan las medidas con el error experimental en sus predicciones de isoeffecto. En su origen carecía de análisis estadísticos que sustentaran la mera observación de la distribución de puntos, pero ahora representa una herramienta de análisis de gran interés (Kortenkamp y Altenburger, 1998). Por otro lado, el empleo del isoblograma bidimensional requiere de un conocimiento exhaustivo de las dosis individuales y combinadas, ya que resulta más preciso cuando se estudian a varios niveles de dosis ( $D_{50}$ ,  $D_{75}$ ). Esta observación sugiere que a diferentes niveles de dosis pueden obtenerse distintos efectos (Berenbaum, 1989; Kortenkamp y Altenburger, 1998; Hertzberg y MacDonell, 2002; Chou, 2006).

En la década de los años 30 y debido a la controversia suscitada entre de los partidarios y los críticos del modelo de Loewe, se empezaron a desarrollar estudios que trataban de paliar las deficiencias de la aditividad de dosis. En los estudios de mezclas de compuestos químicos con diferentes mecanismos de acción o dianas sistémicas o subcelulares distintas, realizados en aquella época surgían grandes problemas en la predicción del efecto. Bliss (1939) propuso una ecuación de estima denominada Principio de Acción Independiente que estaba muy relacionada con el cálculo de

Este método en su versión gráfica surgió para mezclas binarias, pero puede representar combinaciones de hasta tres sustancias, aunque no fue hasta años después cuando se profundizaría en el modelo (Greco y col., 1995). La ecuación matemática,  $I = (d_a/D_A) + (d_b/D_B)$ , resolvía el problema de las mezclas de más de dos compuestos, ya que permite trabajar con un número indefinido de sustancias a la vez (Berenbaum, 1989; Greco y col., 1995; Groten y col., 2001). Sin embargo, tiene limitaciones porque parte de la premisa de que los componentes de la mezcla deben presentar tendencias monotónicas en sus representaciones individuales dosis-respuesta (Loewe, 1953; Berenbaum, 1989; Greco y col., 1992, 1995; Kortenkamp y Altenburger, 1998). Además, sólo es aplicable a mezclas de agentes tóxicos que actúan sobre la misma diana biológica, o cuando teniendo diferentes blancos,

probabilidades de eventos independientes (Greco y col., 1992; Kortenkamp, 2007). A pesar de que este método resolvía algunos problemas que presentaba el modelo de Loewe, ya que podía emplearse con sustancias que presentaban diferentes modos de acción (Cassee y col., 1998; Kortenkamp, 2007), también necesitaba que las curvas dosis-respuesta fueran monotónicas y los efectos individuales de ambos agentes fuesen máximos en alguna dosis (Greco y col., 1992). Durante los años posteriores, se llevaron a cabo estudios complementarios acerca de la Acción Conjunta Independiente de Bliss, proponiendo ligeras variaciones del modelo con nombres sutilmente diferentes como: “Acción Independiente Sencilla” (Finney, 1942), “Suma de Efectos” o “Aditividad de Respuestas” (Groten y col., 2001). Los términos efecto y respuesta presentan en estos casos significados muy concretos que hay que precisar.

Se define **efecto** como: “efecto medio de una mezcla sobre un grupo”, tratándose de una medida cualitativa, que no tiene en cuenta las medidas de cada sujeto, sino del grupo experimental. Sin embargo, el concepto **respuesta** hace referencia a “la tolerancia a la mezcla de cada individuo de la población”, de modo que las dosis que producen daños en cada unidad muestral son diferentes, ya que cada uno presenta una concentración umbral propia. En esta línea, se han desarrollado tres modelos de aditividad de respuestas diferentes en función de la susceptibilidad de los sujetos a los agentes tóxicos (Cassee y col., 1998):

- a. **Correlación positiva completa.** Este modelo indica que, en combinaciones binarias, un compuesto puede ser más tóxico que el otro y por lo tanto el efecto que se observa no es la suma de sus respuestas, sino únicamente la actividad de uno de ellos.

$$E_{AB} = E_A \text{ si toxicidad de } A \geq B.$$

Ejemplo: Si las dosis de dos compuestos A y B producen por separado el 30 y el 20% de muertes respectivamente, la mezcla de AB será del 30% de muertes. Los individuos responden únicamente al compuesto más tóxico.

- b. **Correlación negativa completa.** En este caso, se considera que los individuos son principalmente sensibles a uno de los compuestos y se propone que cada una de las sustancias produzca un efecto independiente en cada individuo. Por lo tanto, el efecto esperado será la suma de las respuestas que induce cada agente por separado.

$$E_{AB} = E_A + E_B \text{ si toxicidad de } B \leq 1.$$

Ejemplo: Si las dosis de dos compuestos A y B producen por separado el 30 y el 20% de muertes respectivamente, la mezcla de AB será del 50% de muertes. Los individuos responden a uno o a otro de los compuestos, a este modelo se le reserva el nombre de Aditividad de Respuestas.

- c. **Modelo sin correlación.** La tercera opción es estrictamente el Criterio de Acción Independiente de Bliss, por el cual un individuo puede responder a cualquiera de los dos compuestos, pero no a los dos a la vez.

$$E_{AB} = E_A + E_B - E_A \cdot E_B$$

Ejemplo: Si las dosis de dos compuestos A y B producen por separado el 30 y el 20% de muertes respectivamente, la mezcla de AB será del 44% de muertes  $[(0.3 + 0.2 - 0.3 \cdot 0.2) = 0.44]$ .

Aparentemente el modelo de Acción Independiente de Bliss modificado era flexible y sólido al tiempo. Sin embargo, aunque se emplea en multitud de trabajos, tiene muchos detractores, debido principalmente a que no se ajusta bien a la premisa de los modelos de autointeracción, imprescindible en modelos de interacción (Berenbaum, 1977, 1981, 1985, 1989; Greco y col., 1992; Kortenkamp y Altenburger, 1998; Borgert, 2007).

En los últimos cincuenta años, multitud de autores han trabajado en la modelización del efecto combinado, entre estos trabajos, hay que destacar uno llevado a cabo en la década de los ochenta que revolucionó las ideas sobre el efecto combinado por encima del resto y ha resultado ser el más influyente y controvertido desde 1970. Los estudios realizados por Chou y Talalay (1984), consistían en el análisis de la aditividad o de la interacción y se realizaban mediante el denominado índice de combinación (IC). Hay que hacer notar que el modelo del IC procede de la ley de acción de masas y que representa una teoría unificadora articulando la ecuación de la cinética enzimática de Michaelis-Menten, la ecuación de Hill de saturación de un receptor, la del pH de ionización de Henderson-Hasselbalch y la de Scatchard de unión al receptor. El empleo del IC se generalizó al ser implementado como el primer programa informático para el análisis del efecto combinado (Chou y Chou, 1987). Estos estudios fueron revisados, validados y propuestos en 1986 por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) como una aproximación a la evaluación del riesgo tras la exposición a mezclas. El nuevo índice se denominó índice de peligrosidad (IP). Posteriormente, Mumtaz y Durkin (1992) propusieron una herramienta diferente teniendo en cuenta este valor, pero ponderándolo mediante un factor denominado evidencia de peso. Este factor depende de múltiples variables, como: conocimiento mecanístico de las interacciones binarias, demostración de toxicidad, modificador de interacción, ruta de exposición y datos *in vitro* entre otros. Actualmente, tanto el IC como el IP se siguen empleando en el cálculo del efecto combinado, debido a la presencia en programas informáticos y a la recomendación por parte de la EPA (Hertzberg y Teuschler, 2002).

Asimismo en el año 2000, la EPA recomendó otro modelo para estudios de efecto combinado que surgió como consecuencia de la crisis alimentaria de las dioxinas polihalogenadas y los furanos hace más de 20 años. Éste se basa en la aplicación del concepto de factor de equivalencia tóxica (FET), que se sustenta matemáticamente en el isóbolo y en la equitoxicidad y consiste en que un compuesto puede ser sustituido por otro diferente a una dosis determinada y producir el mismo efecto.

En los primeros años del siglo XXI se han seguido empleando los modelos continuos lineales, pero también se ha comenzado a profundizar en las aproximaciones curvilíneas que ya habían surgido en los años 90 del siglo pasado. Aunque la verdadera revolución en la toxicología del efecto combinado ha sido el desarrollo de nuevas aplicaciones informáticas (Combitool, Calculusyn, Compusyn, entre otros) que permiten el cálculo de complejas ecuaciones matemáticas no lineales, facilitando en gran medida los cálculos a realizar. Estas técnicas han permitido llevar a cabo estudios tridimensionales empleando modelos matemáticos de estima de efecto combinado para respuestas no lineales, principalmente de tipo sigmoide, a partir de las ecuaciones de Loewe y de Bliss modificadas (Goldoni y Johansson, 2007).

En los últimos años, hay que destacar los trabajos llevados a cabo acerca del análisis del efecto combinado en base a la comparación de la forma de la curva dosis-respuesta de un compuesto y la modificación que sufre tras su combinación. Sühnel (1998) describió estos cambios y los relacionó con los efectos interactivos de las sustancias en gráficas lineales y no lineales, mediante el análisis de pendientes que se sustenta matemáticamente en el análisis de la varianza multifactorial (MANOVA).

En estos momentos, existen otros modelos de estudio que requieren diseños experimentales concretos, como el diseño de rayos de proporción fija, que se aplica al estudio de mezclas múltiples (Gennings y col., 2002; Meadows y col., 2002). Está basado en las pendientes de las curvas dosis-respuesta y en los modelos de aditividad (Gennings y col., 2005). Otras herramientas que se empiezan a utilizar, son los análisis multivariantes como el de componentes principales (PCA), la proyección sobre estructuras latentes (PLS) y el ajuste de regresión.

Es evidente que tras más de cien años de estudio, aún no se ha alcanzado un acuerdo sobre cuál es el modelo más universal y se siguen empleando de manera generalizada el Principio de Aditividad de Loewe y el Criterio de Acción Independiente de Bliss, aunque nunca solos, ya que todos los autores coinciden en que es recomendable emplear diferentes modelos (Berenbaum, 1989; Cedergreen y col., 2008). Este problema no es nuevo y nos ha perseguido desde siempre, ya que: *"All models are wrong, but some are useful"* (Box, 1979). Otro problema relacionado con la predicción es que la elección de los modelos a emplear queda a juicio del investigador. En primer lugar, hay que determinar si los modos de acción de los compuestos presentes en una mezcla son iguales, lo que se decide generalmente con muy pocos datos (Borgert, 2007). Una mala elección del modelo puede provocar que ante los mismos datos, unos indiquen sinergia y otros antagonismo o no interacción. Sin embargo, nunca hay certeza absoluta de estar empleando el modelo más correcto, por lo que la solución que se toma en algunas ocasiones pasa por diseñar el experimento con el fin de emplear un modelo matemático que se conoce y no al revés que sería lo deseable.

En cuanto al diseño experimental, se están realizando actualmente análisis en rangos de toxicidad nulos, algo que se demandaba tiempo atrás, empleando una gran variedad de modelos experimentales y técnicas moleculares (Silva y col., 2002; Pomati y col., 2006, 2008; Yang y Dennison, 2007). El afrontar estudios a dosis subumbrales genera un nuevo problema de tipo matemático, ya que se trata de analizar los efectos que se observan en combinaciones de agentes químicos cuyas concentraciones individuales no son tóxicas o son ligeramente tóxicas. Con este fin, se pueden emplear varias herramientas de estimación puntual, basadas en técnicas de regresión, como concentraciones de efecto ( $EC_{01}$ ), dosis de referencia ( $BMD_{01}$ , *BenchMark Dose*) y valor límite umbral (TLV, *threshold limit value*) (Setzer y Kimmel, 2003; Yang y Dennison, 2007). Sin embargo, debido a las posibles respuestas de tipo hormético (Calabrese, 2008a, b), en algunas ocasiones puede resultar inapropiado como método de estima de efectos. Otro posible método de cálculo de dosis umbral se basa en el empleo de concentraciones de menor efecto observado (LOEC) o sin efecto (NOEC), que se determinan mediante análisis de comparaciones múltiples *a posteriori*, después del análisis de la varianza (ANOVA). Dichos parámetros pueden conducir a error en el caso de que las sustancias presenten efectos horméticos y han sido bastante criticados (OCDE, 1998, 2003).

Ante estas dificultades metodológicas la mejor alternativa para la evaluación de combinaciones de productos químicos a dosis bajas o rangos de toxicidad nulos, es el empleo de mezclas complejas completas. En este tipo de diseño experimental el estudio se realiza sobre la mezcla real obtenida de la matriz correspondiente (suelo, aire, agua, sangre, etc). En algunos casos se analiza mediante técnicas cromatográficas con el fin de obtener un listado de componentes y así intentar asociar los efectos tóxicos observados con las sustancias presentes en la muestra (Eide y col., 2002; Spinsanti y col., 2006; Burger, 2007; Burger y col., 2007). También existen otras posibilidades como la recreación de una mezcla múltiple en base a las concentraciones que han sido detectadas en aguas, tejidos, suelos, etc (Pomati y col., 2006).

Sin embargo, el estudio del mecanismo de acción que subyace al efecto tóxico de mezclas múltiples en rangos de dosis bajos es muy complicado y no suelen obtenerse resultados sencillos de interpretar. En este caso, se emplea un número limitado de compuestos de dosis conocidas. Actualmente, las mezclas sencillas (binarias, ternarias y cuaternarias) creadas por el investigador son las más empleadas. Los ensayos con combinaciones binarias están muy extendidos tanto en biomedicina (Frantz, 2006; Kling, 2006) como en la evaluación toxicológica de contaminantes ambientales (Cleuvers, 2003, 2004; Brain y col., 2004; DeLorenzo y Fleming, 2008).

Cuando se analiza la toxicidad de una mezcla, generalmente se emplean dos métodos combinatorios muy extendidos. El primero de ellos se basa en la dilución de una mezcla creada. Tras elegir una concentración de cada agente y combinarlos, se procede a diluir la mezcla, de modo que se puede generar un rango dosis (1/100; 1/50; 1/10; 1/5; 1/2; 1, etc.). El segundo, recomendado por la EPA, es el denominado diseño factorial completo que resulta extremadamente costoso en mezclas con un número elevado de componentes ya que requiere evaluar todas las combinaciones posibles, es decir  $2^n$ , donde  $n$  es el número de sustancias a combinar. Por ejemplo, cuando se combinan cinco sustancias, hay que analizar todas las combinaciones de 4, 3 y 2 componentes que puedan existir, en este caso 32 grupos de exposición diferentes.

Otro factor importante en el diseño de la combinación, es el tiempo que el sistema biológico está en contacto con la mezcla. La recreación de las exposiciones combinadas que ocurren en la naturaleza, se puede utilizar para desarrollar nuevos diseños experimentales que consideren este aspecto. En el medio ambiente, los organismos estamos expuestos a múltiples sustancias químicas que se presentan todas a la vez y por lo tanto la coexposición es el mejor diseño para abordar esta cuestión. Sin embargo, existen situaciones tanto en estudios de contaminación como en clínica, donde el resultado es más realista si la exposición ocurre de manera secuencial, primero aparece un compuesto, luego otro e incluso *a posteriori* los dos al tiempo (Rice y col., 2008). Como se puede apreciar en la figura 6, las posibilidades son diversas lo que permite un abanico de diseños que probablemente produzca resultados dispares.

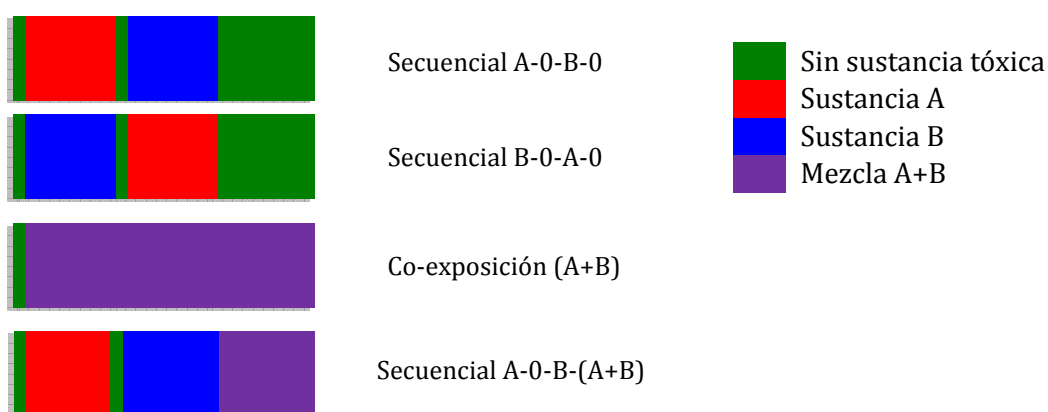


Figura 6. Representación esquemática de algunos posibles diseños de exposición combinada a diferentes sustancias a lo largo del tiempo.

La Unión Europea en su normativa REACH no cita el análisis de mezclas, sino el de preparados químicos, que implican una combinación de sustancias empleadas en formulaciones conjuntas que se comercializan, producen o importan de esta manera. Por lo tanto, en Europa, la legislación existente no se centra en efecto combinado, aunque la presencia de sustancias en ambientes acuáticos hizo que se solicitaran ciertas recomendaciones al Centro Europeo de Ecotoxicología y Toxicología química para afrontar el problema. Este organismo redactó un monográfico en el que se



concluye que es necesario un consenso en la terminología, nuevas herramientas de análisis y número mayor de ensayos, con los que intentar predecir y validar modelos de estima (ECETOC, 2001). Sin embargo, la publicación más preocupante en este sentido es la realizada por el Instituto Internacional de las Ciencias de la Vida europeo (ILSI) que indica que la inocuidad de al menos 65 alimentarios autorizados, debería ser reconsiderada cuando coexisten en un preparado (Groten y col., 2000).

El peligro que representa la contaminación para los organismos vivos ha puesto a trabajar conjuntamente a varias agencias estadounidenses (ATSDR, NIEHS, etc.), aunque no han aportado nada que la EPA no hubiera propuesto ni desde el punto de vista normativo, ni acerca del concepto de interacción química. Por lo tanto, ante la carencia de un marco de trabajo que unifique los diseños experimentales, la progresión del conocimiento en este área de estudio se está lastrando (McCarty y Borgert, 2006; Lambert y Lipscomb, 2007; Teuschler, 2007). La Oficina de Alimentos y Fármacos de EE.UU. (FDA) también se ha visto implicada en el estudio del efecto combinado, ya que necesita conocer con detalle los mecanismos de acción y las posibles interacciones entre medicamentos y/o alimentos (Borgert, 2007).

Las investigaciones sobre el estudio del efecto combinado van más allá del enfoque tradicional de la toxicología cuantitativa y predictiva, centrándose en la determinación de los mecanismos de acción responsables de las alteraciones provocadas tanto por los componentes individuales como por su combinación. Sin embargo, las sustancias químicas rara vez presentan un único mecanismo de acción, lo que complica aún más el estudio (Lambert y Lipscomb, 2007). Por lo tanto, es fundamental conocerlos todos para poder aplicar la aproximación mecanística en el estudio del efecto combinado, como se dijo en la reunión de 2005 de la Sociedad de Toxicología norteamericana (SOT): *“los datos de tipo mecanístico han de ser procesados y recompuestos para formar un puzzle que permita avanzar en el conocimiento, generando un mapa que sirva para avanzar en el estudio de mezclas, ya que éste es un territorio desconocido”* (Mason y col., 2007).

La resolución del problema de riesgo para la salud humana y del medio ambiente pasa, según la SOT, por la evaluación toxicológica de mezclas ambientales. La existencia de mezclas complejas en la naturaleza imposibilita el estudio convencional de predicción cuantitativa, debido al desconocimiento de su composición y fuerza el análisis de los mecanismos de acción (Borgert y col., 2004; Borgert, 2007; Lambert y Lipscomb, 2007; Mason y col., 2007). Por lo tanto, es lógico pensar que el conocimiento del perfil toxicológico de la mayoría de las mezclas ambientales no existe o es difícil de definir (Goodman, 2002; Mason y col., 2007). Para ello y mientras no haya un marco legal de trabajo que defina la pauta a seguir, se recomienda la unificación de los diseños experimentales y el empleo de modelos biológicos que faciliten la extrapolación a humanos (Mason y col., 2007; Teuschler, 2007). En este sentido, la Sociedad de Toxicología estadounidense sugiere el empleo de modelos biológicos, principalmente vertebrados superiores, sobre los que aplicar los dos enfoques que constituyen las líneas maestras del abordaje del estudio del efecto combinado: el *enfoque realista* y el *mecanístico*. El estudio de mezclas complejas sigue siendo hoy por hoy complejo y aunque útil y extremadamente realista, no es fácil de abordar. Por este motivo, los análisis de mezclas simples representan el primer paso en el estudio del efecto combinado. Hoy en día existen múltiples normativas que describen acciones para la evaluación de riesgo de sustancias individuales, sin embargo, adolecen de legislaciones concretas referentes a los protocolos de actuación para valorar el efecto combinado, aunque siempre dejan constancia de que las pruebas de toxicidad que se recomiendan para compuestos individuales pueden ser empleadas para mezclas (McCarty y Borgert, 2006).



La elección del modelo biológico es fundamental en cualquier estudio de toxicidad. El empleo de vertebrados superiores, como recomienda la SOT, tampoco garantiza la interpretación, ni la extrapolación, sin olvidar las reticencias éticas que despiertan este tipo de estudios (Hartung, 2008a; Leist y col., 2008). Por este motivo, antes de realizar estudios de toxicidad con vertebrados, diferentes autores recomiendan el empleo de modelos sencillos (Collins y col., 2008; Leist y col., 2008). En este sentido y basándose en la Directiva 86/609/EEC de la Unión Europea, la Red Española de Métodos Alternativos (REMA) y la Plataforma Europea de Consenso en Alternativas (ECOPA) están trabajando en el desarrollo de sistemas de evaluación sencillos, rápidos, reproducibles y de elevada sensibilidad que no impliquen el empleo de vertebrados superiores (Rogiers, 2005). Este objetivo lo comparte también el Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) que se ha convertido en el responsable de su regulación desde la aprobación del nuevo Reglamento REACH.

Actualmente, cada vez son más los estudios en los que se emplean invertebrados, plantas, algas y bacterias para el análisis de sustancias individuales (Repetto y col., 2001; Jos y col., 2003, 2005; Eguchi y col., 2004) y también en la evaluación de la toxicidad de mezclas (Cleuvers, 2003, 2004; Brain y col., 2004; DeLorenzo y Fleming, 2008). Asimismo, hay que destacar que los cultivos celulares están cobrando un gran interés en el campo de la toxicología, no sólo por su fácil mantenimiento y manejo, sino que además garantizan un control absoluto de las condiciones de crecimiento y por lo tanto resultados reproducibles. Además su extendida aplicación ha permitido la adaptación de técnicas clásicas de Biología celular al campo de la toxicología, ampliando su capacidad de análisis (Zucco y col., 2004; Collins y col., 2008; Leist y col., 2008). Por último, hay que reseñar que las pruebas *in vitro* han sido sometidas a estrictos controles para su validación, que no siempre existen en el caso de las realizadas *in vivo* (Hartung, 2008a, b). A pesar de que no existe una extrapolación directa entre los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* y los organismos completos, se asume que los cambios observados en un organismo tras la exposición a un xenobiótico se deben a que en algún órgano o tejido del cuerpo se alcanzan dosis tóxicas que pueden incluso conducir a la muerte celular (Ekwall y col., 1990).

Desde hace unos años, las líneas celulares de peces han tenido gran auge, ya que representan un modelo de estudio ideal para abordar el problema de contaminación en aguas (Castaño y col., 2003). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que la sensibilidad de las líneas celulares de peces y de mamíferos son similares (Castaño y Gómez-Lechón, 2005; Gulden y col., 2005), presentando ambas una elevada correlación con los estudios realizados *in vivo* (Clemmedson y col., 2000; Gennari y col., 2004; Leist y col., 2008). Actualmente, las líneas celulares de mamífero son las más utilizadas para la evaluación de citotoxicidad de productos químicos (Zucco y col., 2004).

Distintas directrices recogen las dianas celulares prioritarias para llevar a cabo una eficaz evaluación *in vitro* de la citotoxicidad aguda de productos químicos (ECVAM, 2002; ICCVAM, 2003). En todas ellas se propone un estudio a diferentes niveles en el cual hay que elegir adecuadamente el tipo celular, el tiempo de exposición y las metodologías más idóneas para analizar los efectos tóxicos. Entre los parámetros recomendados, destacan el análisis la integridad de las membranas, el citoesqueleto, el metabolismo y la proliferación celular. Sin embargo, la mejor aproximación a este tipo de estudios es la combinación de ensayos bioquímicos y morfológicos, que nos ofrecerán información complementaria y consistente del estado real del cultivo (Fernández Freire y col., 2009).

Los ensayos bioquímicos están englobados en lo que se denomina de manera general ensayos de citotoxicidad. Entendemos por citotoxicidad aquellos efectos adversos o interferencias con estructuras y/o propiedades esenciales para la

supervivencia, la proliferación y/o la función celular (Walum, 1998). Entre todas las dianas de citotoxicidad posibles, algunas son más sensibles que otras, por lo que han de monitorizarse adecuadamente todas ellas.

La citotoxicidad puede clasificarse en tres tipos principales (Ekwall, 1995; Walum, 1998):

- i. **Citotoxicidad basal:** implica la alteración de al menos uno de los procesos o estructuras esenciales (proliferación, supervivencia o función celular) cuya sensibilidad es similar en todos los tipos celulares independientemente de su origen.
- ii. **Citotoxicidad selectiva:** refleja un daño organoespecífico, como consecuencia de procesos de biotransformación, unión específica a receptores o mecanismos específicos de incorporación.
- iii. **Citotoxicidad específica:** afecta a funciones intercelulares que no son vitales para la célula, pero sí para el organismo completo, como por ejemplo la producción y/o liberación de hormonas u otras moléculas de señalización.

La mayor parte de las alteraciones inducidas por xenobióticos tienen su origen en interacciones inespecíficas con diferentes estructuras subcelulares y corresponden por lo tanto a procesos de citotoxicidad basal (Ekwall, 1995). Es evidente, que la relevancia de la información obtenida a partir de los ensayos de citotoxicidad basal depende en gran medida del sistema experimental así como de las técnicas empleadas (Gómez-Lechón y Castell, 1995). En este sentido, nuestra experiencia previa determinando la citotoxicidad basal de contaminantes ambientales de diversos grupos químicos (Fernández Freire y col., 2005, 2008; Labrador y col., 2007; Pérez Martín y col., 2008), nos ha demostrado que, si bien los resultados obtenidos en diversas líneas celulares no difieren demasiado entre ellos (Fernández Freire y col., 2009), la línea celular Vero (*Chlorocebus aethiops*) es más sensible que otras de uso más extendido como HeLa (*Homo sapiens*) y 3T3 (*Mus musculus*). Por lo tanto, se seleccionaron las células Vero para llevar a cabo el presente estudio en el que se ha evaluado la toxicidad *in vitro* de mezclas binarias constituidas por los aditivos autorizados **butilhidroxianisol** (BHA, E320) y **propilparabeno** (PPB, E216).

Ambos compuestos han sido detectados en aguas superficiales en concentraciones que alcanzan niveles en el rango de µg/L (Burse y Pellizzari, 1982; Lee y col., 2005; Canosa y col., 2006). Estas concentraciones representan dosis mucho menores que las capaces de inducir efectos tóxicos *in vivo*. Sin embargo, no se pueden descartar efectos sobre los seres vivos debido a la capacidad de bioacumulación que presentan tanto el BHA (Conacher y col., 1986; Osman y van Noort, 2007), como el PPB (Bjerregaard y col., 2003; Darbre y col., 2004), sin olvidar que estamos sometidos a su exposición de manera crónica (Davì y Gnudi, 1999; Darbre y Harvey, 2008).

El butilhidroxianisol y el propilparabeno se consideran compuestos GRAS (*Generally Recognized As Safe*) y de baja toxicidad si se utilizan en las condiciones definidas por la FDA y las agencias de seguridad química de la Unión Europea (ECHA, EFSA y EMEA). Los aditivos de uso cosmético, farmacéutico y alimentario han suscitado tradicionalmente gran atención y recientemente han vuelto a despertar el interés de la comunidad científica (Stierum y col., 2005, 2008; Irigaray y col., 2007), fundamentalmente porque se presentan siempre en combinación con otros xenobióticos y se desconocen los posibles efectos combinados que pueden surgir tras su uso (Feron y col., 2002). Actualmente, los 350 aditivos alimentarios autorizados en la Unión Europea presentan restricciones en su empleo y las dosis máximas diarias permitidas (ADI, *Acceptable Daily Intake*) de 65 de ellos están siendo reconsideradas como ya hemos comentado (Groten y col., 2000; Stierum y col., 2008). Tanto el PPB

como el BHA son de empleo generalizado en la conservación de preparados de uso y consumo humano y por lo tanto de interés industrial.

Los parabenos han sido utilizados como fungicidas, bactericidas y antioxidantes de manera frecuente desde mediados de los años veinte del siglo pasado (Soni y col., 2005). Se estima que las diferentes variantes químicas de estos compuestos (metil-, etil-, propil-, isopropil-, butil-, isobutil-parabeno) se utilizan en combinación en más de 22.000 formulaciones cosméticas (CIREP, 2008), encontrándolos en el 99 % de los productos comercializados (Rastogi y col., 1995; Shen y col., 2007). Además, el propilparabeno resulta ser el conservante cosmético, farmacéutico y alimentario más utilizado durante los últimos 50 años (Soni y col., 2001). Sin embargo, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios ha recomendado la retirada de los parabenos de cualquier producto alimentario, aunque no ha promovido ninguna acción legislativa en este sentido (JECFA, 2007).

Esta propuesta se debe al hecho de que recientes publicaciones han resaltado las posibles implicaciones de los parabenos en procesos de carcinogénesis, concretamente en la inducción del cáncer de mama (Darbre y col., 2004; Harvey y Darbre, 2004). Aunque este tema actualmente, sigue siendo controvertido, su capacidad para incorporarse al torrente circulatorio (Janjua y col., 2007; 2008) y acumularse en tejidos humanos (Darbre y col., 2004; Darbre y Harvey, 2008) así como de otros seres vivos (Bjerregaard y col., 2003), sigue siendo objeto de preocupación. Por otra parte, existen estudios que definen a los parabenos como alteradores endocrinos tanto *in vivo* (Bergfeld y col., 2005; Golden y col., 2005) como *in vitro* (Gómez y col., 2005; Pugazhendhi y col., 2005; Terasaka y col., 2006; Chen y col., 2007) y otros han descrito su capacidad para inducir incrementos de proliferación en diferentes tejidos animales expuestos a través de la dieta (Nera y col., 1984; Hirose y col., 1986; Rodrigues y col., 1986). Las discusiones sobre este tema concluyen generalmente con la idea de que el propilparabeno está relacionado con la promoción de tumores, pero no con la inducción (Soni y col., 2005; CIREP, 2008).

Por su parte, el butilhidroxianisol también tiene un uso muy extendido desde que se autorizó en los años cincuenta, apareciendo en diferentes productos entre los que destacan los preparados alimentarios y cosméticos (IARC, 1987; Verhagen y col., 1991). De la misma forma que los parabenos, el BHA ha sido asociado con la promoción de tumores, aunque nunca con la inducción (Verhagen y col., 1991; Williams y col., 1999) y ha sido reconocido como posible carcinógeno para humanos (IARC, 1987). A pesar de esto, actualmente su uso está autorizado porque no está demostrado que existan riesgos para la salud humana e incluso, según algunos autores, presenta efectos beneficiosos por sus propiedades antioxidantes (Williams y col., 1999; Groten y col., 2000; Sasaki y col., 2002).



## Hipótesis de partida y objetivos



### Hipótesis de partida

La gran cantidad de sustancias a las que se encuentran expuestos de forma simultánea los organismos vivos ha despertado, en la comunidad científica y en la sociedad en general, un creciente interés por conocer los posibles efectos tóxicos causados por la combinación de productos químicos. En este sentido se han desarrollado múltiples aproximaciones experimentales, incluyendo complejos modelos matemáticos destinados a la predicción, que no siempre han respondido con resultados convincentes.

Por este motivo nos planteamos contrastar si una estrategia de ensayo basada en un modelo celular de reconocida sensibilidad en estudios de toxicidad individual podría aplicarse a la evaluación y predicción de la toxicidad de mezclas químicas.

### Objetivos

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar la toxicidad de mezclas químicas binarias, compuestas por dos aditivos industriales autorizados, el tert-butil-hidroxianisol y el propil p-hidroxibenzoato, utilizando un protocolo experimental *in vitro*.

Con el fin de llevar a cabo nuestro propósito, establecimos los siguientes objetivos concretos:

- I. Evaluar los efectos tóxicos inducidos por BHA, PPB y sus mezclas sobre los cultivos de células Vero.
- II. Comprobar si los efectos de las combinaciones binarias BHA-PPB se pueden predecir aplicando diferentes modelos matemáticos.
- III. Proponer un mecanismo de acción tóxico que explique las alteraciones producidas por la exposición a ambos aditivos industriales tanto de manera individual como combinada.
- IV. Determinar si el conocimiento del mecanismo de acción de las sustancias individuales permitiría predecir los efectos inducidos por las mezclas.





## Material y Métodos



## 1. Compuestos seleccionados para el estudio

Las propiedades físico-químicas del 3-tert-butil-4-hidroxianisol más conocido como butilhidroxianisol (BHA, N° CAS: 25013-16-5) y del propil-4-hidroxibenzoato, conocido como propilparabeno (PPB, N° CAS: 94-13-3) se resumen en la tabla 2.

El BHA tiene un peso molecular de 180.25 g/mol y se presenta como un sólido de color blanco o ligeramente amarillo ceroso, con un débil olor característico. Es insoluble en agua, pero se disuelve en etanol al 50 % (v/v) y otros solventes apolares (Verhagen y col., 1991). El BHA (Sigma-Aldrich Co. EE. UU.) se solubilizó en etanol absoluto (Panreac Química S.A., España) para preparar dos concentraciones stock de  $10^{-1}$  y  $10^{-3}$  M.

El propilparabeno es un éster del ácido p-hidroxibenzoico estable en presencia de aire y no volátil, con un peso molecular de 180.21 g/mol. Se presenta como polvo cristalino blanco, sin olor o sabor. En general, los parabenos son solubles en solventes orgánicos como alcoholes, éter, glicerina y propilenglicol. Los ésteres del ácido p-hidroxibenzoico, entre los que se incluye el PPB, son muy estables en un amplio rango de pH y temperatura (Soni y col., 2001; CIREP, 2008). Para nuestros experimentos se preparó una solución  $10^{-1}$  M de PPB (Sigma-Aldrich) en dimetilsulfóxido (Panreac).

Las soluciones de BHA y PPB se prepararon en fresco antes de cada experimento y se mantuvieron protegidas de la luz y la humedad a temperatura ambiente.


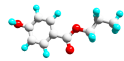
Características	Butilhidroxianisol	Propilparabeno
N° CAS	25013-16-5	94-13-3
Fórmula gráfica		
Fórmula química	$C_{11}H_{16}O_2$	$C_{10}H_{12}O_3$
Peso molecular (g/mol)	180.25	180.21
Punto de fusión (°C)	45.0-63.0	96.2-98.0
pKa	8.80	8.35
Máximo de absorbancia (nm)	226.0	256.0
Log P	0.42	2.71
Ingesta diaria autorizada (mg/Kg)	0.5	10.0

Tabla 2. Propiedades físico-químicas del butilhidroxianisol y propilparabeno (NIEHS, 1991; Verhagen y col., 1991; Soni y col., 2001; Grung y col., 2007; CIREP, 2008).

## 2. Cultivos celulares

### 2.1. Línea celular

Para llevar a cabo nuestro estudio, se ha seleccionado la línea celular establecida de mamífero Vero (ATCC CCL-81). Este tipo celular (figura 7) presenta unas determinadas características que la convierten en un modelo óptimo para la observación de estructuras subcelulares y la realización de los estudios morfológicos que se llevan a cabo en este estudio, como su citoplasma amplio y plano y la elevada densidad de orgánulos citoplasmáticos (Grigoriev y col., 1997). Es una línea celular aneuploide procedente de riñón de *Chlorocebus aethiops*, desarrollada el 27 de marzo de 1962 por Y. Yasumura y Y. Kawakita en la universidad de Chiba, Japón. Posteriormente fue cedida a la ATCC (American Type Culture Collection), en el pase 113, propagándose hasta el pase 121 para establecer un banco disponible de células (Yasumura y Kawakita, 1963). Se han utilizado ampliamente en estudios de virología y su origen renal las ha convertido también en un buen modelo recomendado para estudios toxicológicos (ISO, 1999; Sonnenbichler y col., 1999; Romero y col., 2004; Fernández Freire y col., 2009).

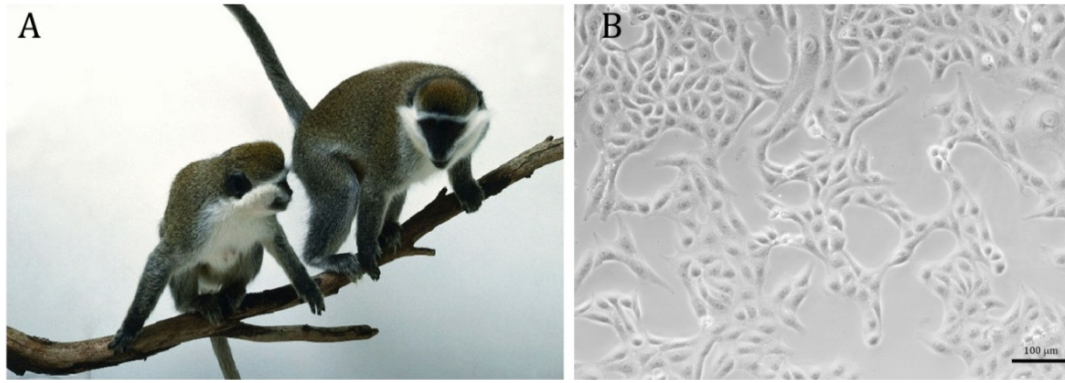


Figura 7. (A) *Chlorocebus aethiops*, organismo del que procede la línea celular de fibroblastos de riñón de mono verde africano (imagen tomada de <http://www.dkimages.com>). (B) Visión general de un cultivo de células Vero. Barra 100  $\mu\text{m}$ .

### 2.2. Infraestructura y material de cultivos.

El mantenimiento de cultivos celulares *in vitro* requiere un elevado grado de esterilidad que implica el uso de un laboratorio P2, que en nuestro caso está equipado con el siguiente material:

- Aparatos
  - Cabina de flujo laminar vertical FLVA150 (TDI, España) apta para un nivel de bioseguridad 2.
  - Incubador de CO<sub>2</sub> Heraeus 150 (Heraeus, Alemania).
  - Microscopio binocular invertido CH-BI45-2 Olympus (Japón) con objetivos 4x, 10x y 20x.
  - Baño termostatzado a 37 °C (Selecta Precistern, España).
- Medio y suplementos. Se emplearon los siguientes medios y reactivos estériles distribuidos por Lonza (Bélgica).
  - Medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM) con 4.5 g/L de glucosa y rojo fenol.
  - L – Glutamina 200 mM, 0,85 % NaCl.
  - Mezcla de antibióticos: Penicilina – Estreptomicina (10.000 U/mL).
  - Suero Fetal Bovino.
  - Tampón fosfato salino 1x (PBS), pH = 7.2 – 7.4.
  - Tripsina 2,5 %.
  - Tripsina – EDTA (200 mg/L Versene EDTA).
  - Medios de cultivo.
    - Medio completo sin suero (MCSS). Mezcla de DMEM con 1 % de L – glutamina (v/v) y 1 % de antibióticos (v/v).
    - Medio completo con suero (MCCS). Se trata del medio en el que se mantiene en pase al cultivo, es MCSS al que se añade 5 % de suero fetal bovino (v/v).
    - Medio de congelación. Está compuesto por una mezcla de dimetilsulfóxido (Serva, Alemania) al 10% (v/v) en suero fetal bovino.
- Material desechable. El material plástico de poliestireno estéril para el cultivo de células (frascos y placas multipocillo) se ha obtenido de BD Falcon™ (BD Biosciences, EE. UU.). Los criotubos de 1.2 mL para congelación son de Cultek (España), mientras que los cubreobjetos de cristal de 15x15 y 20x20 mm<sup>2</sup> son de Menzel – Glaser (Alemania).

### 2.3. Mantenimiento de los cultivos

El cultivo se inicia a partir de un vial de células conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en medio de congelación. Tras una descongelación rápida en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$ , las células se siembran en frascos de  $25\text{ cm}^2$  con medio completo con suero al 5 % (v/v), manteniéndose a  $37^{\circ}\text{C}$  de temperatura en un incubador en atmósfera de 5 % de dióxido de carbono. Transcurrido el tiempo necesario para la adhesión de las células viables, normalmente 4 – 5 horas, se retira el medio de cultivo, se lavan las células con PBS 1x y se añaden 5 mL de medio de cultivo limpio para eliminar el dimetilsulfóxido (DMSO) y las células no viables.

Una vez que las células han alcanzado un grado de confluencia entre el 70 y el 90 %, se realiza un subcultivo, incrementando la superficie de crecimiento. Para ello, se retira el medio de cultivo y se lavan las células con PBS 1x a  $37^{\circ}\text{C}$ . Utilizamos un método de disgregación enzimática con el fin de conseguir una suspensión celular añadiendo al frasco de cultivo unas gotas de una mezcla de tripsina/tripsina – EDTA 0.25 % durante 1 minuto. Transcurrido ese tiempo se retira la tripsina y se incuba el frasco a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. El bloqueo de la actividad de la tripsina se consigue resuspendiendo las células en medio de cultivo con suero, puesto que este último inactiva la enzima. Una alícuota de esta suspensión se añade a un nuevo frasco con medio de cultivo y se deposita nuevamente en el incubador.

Esta suspensión celular es la que se emplea para la siembra en las distintas placas de cultivo utilizadas en los experimentos. Con el fin de mantener las mismas condiciones experimentales se procedió a realizar siembras controladas con un número exacto de células. Para determinarlo, se realizaron recuentos empleando un hemocitómetro, procesando el cultivo de acuerdo con el test de exclusión de azul tripán. Tras recogerse las células en medio de cultivo completo con suero, se prepara una alícuota de suspensión celular y se mezcla con azul tripán al 0.4 % (p/v) (Sigma-Aldrich) a partes iguales, realizándose el recuento del número de células viables y no viables por mililitro, mediante una cámara de Bürker (Exacta, Alemania) en un microscopio Zeiss 20T con contraste de fase (Zeiss, Alemania).

El primer paso es determinar el número real de células que hay en los cultivos, utilizando para ello los factores de dilución adecuados. A partir de estos valores se realizan los cálculos pertinentes para estimar el volumen de suspensión celular que se ha de sembrar.

$$\text{Nº de células} = \text{Nº obtenido en el recuento} \times 2 \times \text{volumen muestra (mL)} \times 1 \times 10^4$$

El proceso de subcultivo ha de realizarse 2 ó 3 veces por semana y en cualquier caso, a las células se les hará un lavado con PBS 1x y un cambio de medio cada 3 días. Los experimentos se realizaron siempre con células que estaban entre los pases 3 y 10.

Cuando las células se encuentran en este intervalo de pases, se procede a crear un banco de células congeladas. La congelación consiste en hacer un lavado en PBS 1x y obtener una suspensión celular por tripsinización, parando la reacción con medio de congelación. Ésta suspensión celular se transfiere a un criotubo y se dispone en un recipiente con isopropanol (Panreac), dentro de un arcón a  $-80^{\circ}\text{C}$ . De este modo, se consigue que el proceso de congelación sea gradual, con un descenso de la temperatura de  $1^{\circ}\text{C}$  cada minuto. La presencia de DMSO en el medio de congelación evita la formación de cristales de agua en las células y la consiguiente ruptura de las membranas celulares. Los viales pueden permanecer congelados a

-80 °C varios meses manteniendo su capacidad de regeneración, aunque ésta se va perdiendo de manera gradual.

### 2.4. Condiciones de tratamiento

#### 2.4.1. Exposición continua

Se procedió a la siembra de  $8 \times 10^4$  células/mL para los experimentos con una duración no superior a 24 horas. Transcurridas entre 20 y 24 horas de la siembra exacta y siempre dentro del periodo de crecimiento exponencial del cultivo, las células fueron expuestas a las distintas concentraciones de los compuestos (tabla 3). Las soluciones de BHA y PPB se esterilizaron empleando filtros de  $0,22 \mu\text{m}$  (Millipore®, E.E.U.U.), una vez disueltas en medio de cultivo en la denominada solución de ensayo.

Compuesto	Solución inicial	Rango de concentraciones
BHA	$10^{-1}$ y $10^{-3}$ M	1 - 300 $\mu\text{M}$
PPB	$10^{-1}$ M	50 - 500 $\mu\text{M}$

Tabla 3. Preparación de las dosis de BHA y PPB ensayadas.

La preparación de las distintas concentraciones de droga se realizó en fresco a partir de sus soluciones iniciales, siempre en MCCS al 1 % (v/v). La disminución al mínimo del porcentaje de suero minimiza la unión inespecífica de los compuestos a estudiar con las proteínas del suero, que puede ser muy elevada en algunos casos. De este modo, se consigue que la concentración nominal y la efectiva sean lo más similares posible. El suero no se elimina totalmente, porque las células son dependientes para su normal adhesión y proliferación. El porcentaje de disolvente fue  $\leq 1$  % (v/v) para el etanol y  $\leq 0.5$  % (v/v) para el dimetilsulfóxido, de modo que no mostraron efecto sobre el cultivo, como determinaron los correspondientes controles. Transcurrido el tiempo de incubación con las distintas concentraciones de los compuestos, se procesaron las células según los requerimientos específicos de cada prueba.

#### 2.4.2. Toxicidad retardada

Tras proceder con la siembra del cultivo ( $2.5 \times 10^4$  células/mL), expusimos a las células al tóxico a evaluar durante el tiempo estimado (24 h). Tras esta incubación, retiramos el medio con droga, lavamos con PBS 1x abundantemente y lo sustituimos por medio de cultivo completo al 5 % (v/v) sin droga durante el tiempo elegido (24 y 48 horas). Al finalizar este periodo, se cuantificó el efecto producido empleando diferentes parámetros.

### 3. Diseño del protocolo experimental

El diseño experimental, el modelo biológico y los parámetros a evaluar son los tres factores implicados en la calidad y la especificidad de los datos que se obtienen en los estudios que emplean modelos *in vitro* (Gómez-Lechón y Castell, 1995).

El abordaje de los estudios de mezclas que proponemos en este trabajo, requiere un protocolo de actuación estructurado en etapas consecutivas que se resume en la figura 8. Nuestra propuesta parte del conocimiento de los efectos tóxicos de las sustancias químicas a evaluar tanto en el modelo experimental elegido para llevar a cabo el estudio, como en otros diferentes a los que tenemos acceso por medio de la información bibliográfica.

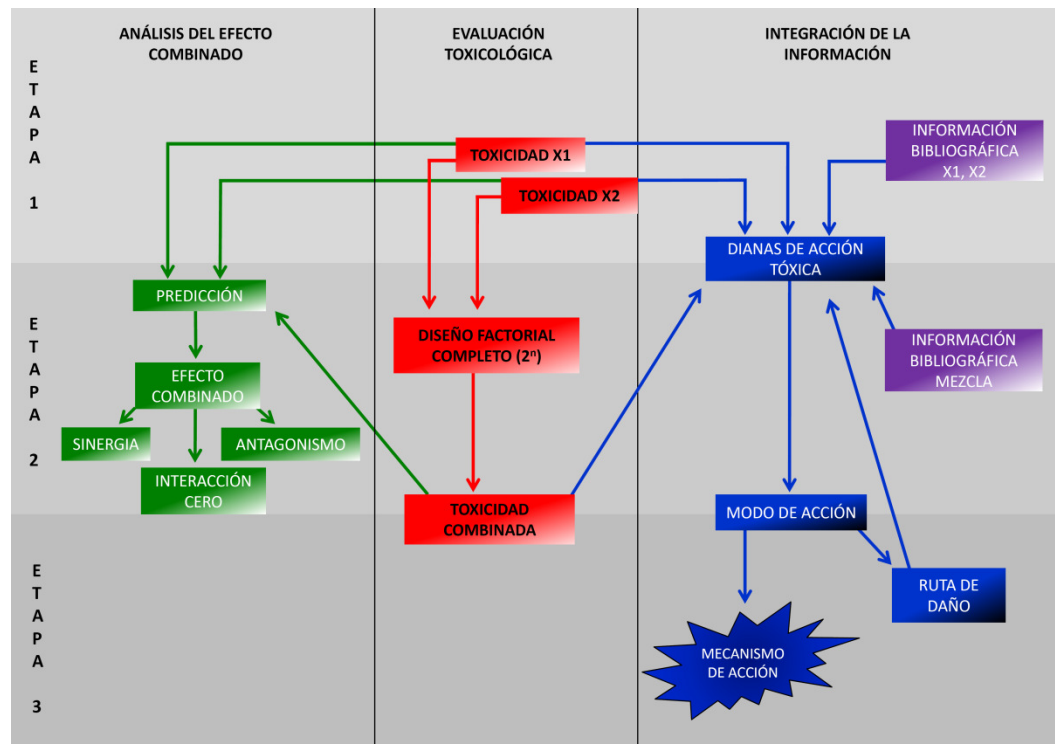


Figura 8. Fases del diseño experimental propuesto para el estudio de mezclas químicas.

En una **primera etapa**, se llevaron a cabo estudios de citotoxicidad basal de los compuestos individuales que componen la mezcla, que incluyen estudios de viabilidad, proliferación y morfología celular general. El análisis microscópico de la morfología celular se basa en diversas recomendaciones que permiten poner de manifiesto interferencias con estructuras esenciales para la supervivencia que no siempre son detectables con los ensayos cuantitativos de citotoxicidad basal (Ekwall y col., 1990; Spielmann y col., 1999; Fernández Freire y col., 2009). La morfología celular general se estudió seleccionando concentraciones de relevancia para cada compuesto, aplicando técnicas sencillas que permiten definir el efecto tóxico.

Los estudios de toxicidad individual se realizaron con exposiciones de 24 horas, un tiempo recomendado para este tipo de ensayos, puesto que supera la duración de un ciclo de división del cultivo (ICCVAM, 2001; Castaño y Gómez-Lechón, 2005; Gulden y col., 2005). Esta aproximación nos permite determinar parte del perfil toxicológico de los compuestos, precisando el rango de toxicidad basal de cada uno de ellos.

En esta fase, el trabajo de revisión bibliográfica permitió construir un listado de potenciales alteraciones o dianas sobre las que los compuestos tienen capacidad de interaccionar de manera individual o en combinación.

En una **segunda etapa** y en base a todos los datos previos, se procede a establecer las concentraciones que se emplearán para analizar la toxicidad de la mezcla por medio de un diseño factorial completo. Este tipo de análisis obliga a evaluar un elevado número de grupos de tratamiento ( $2^n$ , donde  $n$  es el número de sustancias que componen la mezcla), ya que es necesario el estudio de todas las combinaciones intermedias posibles. Además, con los datos de la toxicidad individual obtenidos, se puede proceder a estimar el efecto combinado que

esperaríamos obtener en nuestro sistema modelo, siempre que se cumplan las asunciones matemáticas del modelo predictivo.

La metodología que se emplea en la evaluación del efecto combinado en esta segunda fase del estudio fue la misma que se usó en la primera etapa (viabilidad, proliferación y morfología celular general). Además, los tratamientos individuales fueron incluidos de nuevo en todos los experimentos para controlar que el efecto que se observa de manera individual no difería del obtenido previamente. Con los resultados obtenidos en esta segunda etapa, se procedió a analizar qué combinaciones producían efectos tóxicos más relevantes para llevar a cabo el estudio del modo y/o mecanismo de acción tóxica de estas mezclas.

En una **tercera etapa**, se emplearon técnicas específicas que ayudan a definir las rutas de daño implicadas en el proceso tóxico observado, lo que nos ayudó a determinar si el modo de acción propuesto es correcto.

Nuestro diseño experimental incorpora una gran variedad de pruebas que cubren un amplio rango de mecanismos de acción tóxica, sin ser un conjunto cerrado, ya que una de las grandes ventajas del sistema utilizado, es la posibilidad de incrementar la batería de técnicas empleadas según vayan surgiendo necesidades durante la evaluación. En nuestro trabajo hemos empleado ensayos que permiten conocer la integridad de las membranas celulares, la fisiología mitocondrial, el estado del citoesqueleto, la adhesión celular, el daño al ADN, el nivel de expresión génica y de proteínas, el estrés oxidativo y el progreso del ciclo celular entre otras.



## 4. Metodología

### 4.1. Viabilidad celular

#### 4.1.1. Reducción del MTT

##### *Fundamento*

Cuando la sal de tetrazolio MTT (3 - [4, 5 - dimetiltiazolil - (2)] - 2, 5 - difenil - 2H - bromuro de tetrazolio) se añade al medio de cultivo, las células viables la incorporan en su interior y una vez en el citoplasma, atraviesa la doble membrana mitocondrial donde la enzima, succinato deshidrogenasa, reduce el MTT soluble a formazán insoluble de color azul.

Las células muertas y las dañadas en su membrana plasmática, o con la función mitocondrial alterada como consecuencia de la acción citotóxica de un xenobiótico, no pueden reducir el MTT y por lo tanto, no producen formazán azul. Una vez retirado el medio, se solubiliza convenientemente el producto final y se procede a la lectura del color desarrollado que, en comparación con el cuantificado en los cultivos control, es un indicador directo del número de células que permanecen funcionales.

El test del MTT se ha realizado básicamente según el protocolo descrito por Mosmann (1983), pero utilizando DMSO puro como disolvente del formazán de acuerdo al procedimiento descrito por Denizot y Lang (1986).

##### *Reactivos*

- MTT (Sigma-Aldrich).
- PBS 1x.
- Medio completo sin suero.
- Dimetilsulfóxido (Panreac).

##### *Procedimiento*

- Se preparó una solución stock del MTT 5 mg/mL en tampón fosfato salino 1x. Una vez disuelta se esterilizó por filtración mediante un filtro Millipore® 0.22 µm y se conservó en un frasco de vidrio opaco a 4 °C.
- Esta solución stock se diluyó antes del ensayo en medio completo sin suero en la proporción 1/11 y se mantuvo a 37 °C.
- En condiciones de esterilidad y una vez finalizado el tratamiento, se vació el medio de cultivo de los pocillos por aspiración y se lavaron dos veces con tampón fosfato salino 1x a 37 °C.
- Se añadió a cada pocillo 1 mL de medio de cultivo con el MTT ya incorporado y se incubaron las placas durante 2 horas a 37 °C y con atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5 %.
- Tras la incubación y fuera de cabina, se retiró el medio por aspiración, apurando bien los pocillos.
- Se añadió a cada pocillo 1 mL de DMSO y para facilitar la disolución del formazán se utilizó un baño de ultrasonidos (Branson 2200) en el que se efectuaron 3 pulsos de 5 segundos.
- Transcurridos 10 minutos a temperatura ambiente, se procedió a leer el color desarrollado.

### *Lectura y procesamiento de los datos*

- Se ajustó el lector de placas SPECTRAFluor (Tecan, Austria). Modo: Fotométrico (Absorbancia).  $\lambda = 570$  nm.
- A los resultados obtenidos, se les restó convenientemente el blanco medido previamente.
- El cálculo del porcentaje de viabilidad con respecto al control se realizó dando el valor 100 a la media de absorbancia de los controles.

### 4.1.2. Captura de rojo neutro

#### *Fundamento*

Con el fin de evaluar la integridad de las membranas celulares y en especial las del compartimento endosomal, se empleó el test del rojo neutro, que consiste en la captación de dicho colorante vital por parte de los lisosomas de células con membranas no dañadas. El rojo neutro presenta gran afinidad por compartimentos ácidos, por ello tiene gran preferencia por el compartimento endosomal. El mecanismo por el cual el colorante queda recluido en el interior, es la protonación de la molécula. El compuesto con una carga positiva no puede atravesar las membranas y se almacena en los lisosomas. La cuantificación del colorante vital incorporado por las células es llevada a cabo por medidas de absorbancia, a 542 nm, del colorante extraído por una mezcla de ácido acético/etanol, existiendo una relación lineal entre la densidad óptica y el número de células vivas (Borenfreund y Puerner, 1985).

#### *Reactivos*

- Rojo neutro (Merck, Alemania).
- PBS 1x.
- Medio completo sin suero.
- Cloruro de calcio (Merck).
- Formaldehído (Panreac).
- Etanol absoluto (Panreac).
- Ácido acético glacial (Merck).
- Agua destilada.

#### *Procedimiento*

- La solución madre de rojo neutro (4 mg/mL) en agua bidestilada esterilizada por filtración mediante un filtro Millipore® 0.22  $\mu$ m se conservó en un frasco de vidrio opaco a 4 °C.
- Con ella se preparó una solución en medio de cultivo completo sin suero (50  $\mu$ g/mL) que se dejó toda la noche en estufa a 37 °C y se centrifugó antes de usarlo durante 10 minutos a 1500 r.p.m para retirar los precipitados cristalinos.
- Tras retirar el medio por aspiración una vez acabado el tratamiento deseado y en condiciones de esterilidad, se lavaron los pocillos con PBS 1x a 37 °C.
- Posteriormente, se añadió a cada pocillo 1 mL de medio de cultivo con rojo neutro ya incorporado y se incubaron las placas durante 3 horas a 37 °C y con atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5 %.
- Transcurrido este tiempo, se retiró el medio por aspiración y para el lavado de los pocillos, se empleó un tampón que contenía formaldehído al 1 % (v/v) y CaCl<sub>2</sub> al 1 % (p/v) en agua destilada.

- Una vez lavados los pocillos, se retiró el tampón por aspiración apurando bien los pocillos. Se añadió el tampón de extracción del colorante que era una mezcla de 1 % de ácido acético glacial (v/v) y 50 % de etanol absoluto (v/v) en agua destilada. Para facilitar la extracción del colorante incorporado se utilizó un baño de ultrasonidos (Branson 2200) en el que se efectuaron 3 pulsos de 5 segundos.
- Transcurridos 10 minutos a temperatura ambiente, se procedió a leer el color desarrollado.

#### *Lectura y procesamiento de los datos*

- Se ajustó el lector de placas SPECTRAFluor. Modo: Fotométrico (Absorbancia).  $\lambda = 542$  nm.
- A los resultados obtenidos, se les restó convenientemente el blanco medido previamente.
- El cálculo del porcentaje de viabilidad con respecto al control se realizó dando el valor 100 a la media de absorbancia de los controles.

#### 4.1.3. Ensayo de exclusión de azul tripán

##### *Fundamento*

Se empleó el test de exclusión de azul tripán porque es un ensayo rápido, sencillo y sensible que evalúa la integridad de la membrana plasmática, como una pieza clave en el mantenimiento de la viabilidad celular.

##### *Reactivos*

- PBS 1x.
- Tripsina y tripsina-EDTA.
- Medio completo con suero.
- Azul Tripán 0.4 % (Sigma-Aldrich).

##### *Procedimiento*

- Tras el tratamiento, se recogieron por separado las células del sobrenadante y las que permanecían ancladas al sustrato siguiendo los pasos descritos anteriormente para la tripsinización.
- Se preparó una mezcla de suspensión celular y azul tripán como se explicó para los recuentos de número de células.

##### *Recuento y procesamiento de los datos*

- En primer lugar, se determinó el número real de células que había en los cultivos analizados. En este caso, se realizó el recuento separando las células marcadas con azul tripán de las no marcadas.
- Con estos datos, se pudo calcular el porcentaje de células positivas a azul tripán, que son aquellas que presentan fallos en la integridad de la membrana plasmática.

### 4.2. Análisis de la proliferación

#### 4.2.1. Método de Bradford

##### *Fundamento*

Cuando la acción tóxica de un xenobiótico ocasiona la muerte de las células de un cultivo, las interacciones con la biomatriz dejan de ser estables y la unión con el soporte del cultivo se rompe. Así pues, las células muertas que se desprenden y permanecen flotando son eliminadas fácilmente cuando se retira el medio de cultivo y se lava la monocapa. En estas circunstancias, la determinación de la proteína celular que permanece retenida en los pocillos en comparación con la de los cultivos controles es un indicador directo del porcentaje de células vivas.

La técnica empleada se basa en el método de Bradford (1976), con ligeras modificaciones para adaptarlo a las condiciones limitantes de volumen de las placas de 24 pocillos en las que fue realizado el ensayo. Este método se basa en la tinción inespecífica de proteínas con azul de Comassie (G – 250). La cuantificación se consigue por lectura colorimétrica a 595 nm e interpolación con los puntos de una recta patrón de albúmina de suero bovino (BSA) al 1% (p/v).

##### *Reactivos*

- PBS 1x.
- Albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich).
- Agua destilada.
- Reactivo de Bradford concentrado (BioRad, Alemania).

##### *Procedimiento*

- Se construyó una recta patrón de concentraciones conocidas (0 a 25 µg/mL), donde la absorbancia del colorante muestra linealidad partiendo de una solución madre de BSA (100 µg/mL) en agua destilada, justo antes de la valoración.
- Muestras a estudio.
  - i. Una vez finalizado el tratamiento se lavaron los pocillos dos veces con tampón fosfato salino 1x a 37 °C. Después, se añadieron 0.5 mL de PBS 1x en cada pocillo y se lisaron las células de la placa mediante el empleo de un rascador.
  - ii. En otra placa vacía, se procesaron las muestras: a 680 µL de agua destilada se les añadieron 120 µL de lisado celular de cada pocillo y posteriormente se agregaron 200 µL del reactivo de Bradford concentrado. Se agitó la placa y se leyó a 595 nm. Cuando los valores de absorbancia se salieron del rango de valores de la recta patrón, hubo que diluir partiendo del lisado de células.

##### *Lectura y procesamiento de los datos*

- Se ajustó el lector de placas SPECTRAFluor. Modo: Fotométrico (Absorbancia).  $\lambda = 595$  nm.
- Tras la lectura de la densidad óptica de las placas, se interpoló sobre la recta patrón.
- Se calculó la cantidad de proteína real en cada pocillo multiplicando por el factor de dilución. El contenido de proteína celular total se representó como porcentaje respecto al control, dando el valor 100 a la media de los controles.

#### 4.2.2. Análisis de la tasa de división

##### *Fundamento*

La interacción de sustancias tóxicas con las células de un cultivo puede ocasionar alteraciones en el normal desarrollo del ciclo celular. Estos efectos se traducen en variaciones de las tasas de división, bien incrementando o bien inhibiendo la proliferación celular. La determinación del índice mitótico nos permite realizar un estudio detallado del porcentaje de células del cultivo que se encuentran en división. La clasificación de las células en cada una de las fases de la mitosis se realiza siguiendo los criterios morfológicos clásicos, mediante tinción específica de la cromatina.

Para llevar a cabo los recuentos se emplearon células crecidas en cubreobjetos y teñidas con un fluorocromo que se intercala específicamente en el canal menor del ADN, Hoechst 33258 (2' - 4 - (Hidroxifenil) - 5 - (4 - metil - 1 - piperazinil) - 2, 5' - bis - 1H - benzimidazol).

##### *Reactivos*

- Metanol absoluto (Panreac).
- Hoechst 33258 (Riedel-de Haën®, Alemania)
- Agua destilada.
- PBS 1x.
- DePex® (Serva).

##### *Procedimiento*

- Fijación en metanol absoluto a -20 °C durante 7 minutos.
- Incubación durante 1 minuto a temperatura ambiente en presencia de la disolución 5 µg/mL de Hoeschst 33258 en agua destilada.
- Lavado en PBS 1x.
- Dejar secar y montar en DePex®.

##### *Recuento y procesamiento de los datos*

El recuento del número de células que se encuentran en cada fase de la mitosis nos permite obtener los valores del índice mitótico (IM), pero también del índice de fases. El IM representa la tasa de división del cultivo y es el porcentaje de células que se encuentran en mitosis respecto del total de células contadas, mientras que el índice de fases (IF) expresa el porcentaje de células que se encuentran en cada fase de la mitosis, respecto del total de células que están en división.

$$\text{IM} = (\text{N}^{\circ} \text{ de células en división} / \text{N}^{\circ} \text{ de células totales}) \times 100$$

$$\text{IF} = (\text{N}^{\circ} \text{ de células en cada fase} / \text{N}^{\circ} \text{ de células en división}) \times 100$$

#### 4.2.3. Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo

##### *Fundamento*

El análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo se basa en la capacidad del colorante yoduro de propidio de emitir fluorescencia tras unirse en el ADN de manera estequiométrica. Aplicando esta propiedad al hecho de que la carga de ADN de una célula varía a lo largo del ciclo celular, podemos cuantificar la cantidad de material genético y posteriormente calcular el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular, mostrándolo como un histograma. El yoduro

de propidio tiene también capacidad de interactuar con el ARN y para evitar esta posible interacción, la muestra fue procesada con ribonucleasa A (RNasa A) con el fin de eliminarlo y evitar distorsiones en el análisis.

### *Reactivos*

- Tripsina y tripsina-EDTA.
- Tampón fosfato salino 1x.
- Etanol 70 % (Panreac).
- RNasa A de páncreas bovino (Sigma-Aldrich).
- Citrato de sodio tribásico dihidratado (Merck).
- Ioduro de propidio (Sigma-Aldrich).

### *Procedimiento*

- Tras el tratamiento, se recogieron las células del sobrenadante y las que permanecían ancladas al sustrato siguiendo los pasos descritos anteriormente para la tripsinización.
- Se centrifugaron 10 minutos a 1500 r.p.m. y se retiró el medio. Se resuspendió el sedimento en 1 mL de PBS 1x y se volvió a centrifugar durante otros 10 minutos a 1500 r.p.m.
- Se retiró el tampón fosfato salino 1x y se añadió 1 mL de etanol 70 % frío (-20 °C) gota a gota, mientras lentamente se agitaban las células en un vórtex. Así se almacenaron a 4 °C durante al menos 18 horas.
- Tras resuspender el sedimento, se centrifugaron las células 10 minutos a 1500 r.p.m. Se retiró el sobrenadante y se añadió 1 mL de tampón de ciclo (RNasa A 50 µg/mL y ioduro de propidio 50 µg/mL en citrato sódico tribásico dihidratado al 0.1 % (p/v) en agua bidestilada).
- Se mezcló bien y las células se incubaron 30 minutos en oscuridad.
- Tras este tiempo, se cuantificó la carga de ADN de las células mediante citometría de flujo.

### *Recuento y procesamiento de los datos*

Se utilizó un sistema de citometría Coulter EPICS® XL-MCL™ (Beckman Coulter Inc., EE. UU.), equipado con un láser de Argón 488 para el análisis de muestras. Se cuantificó la carga de ADN de al menos 15.000 células por experimento y se realizaron al menos tres réplicas de cada uno. Los datos se procesaron mediante las aplicaciones *Expo32 ADC* (Beckman Coulter Inc.) y *ModFit LT™ 3.0* (Verity Software House Inc., EE. UU.).

## 4.3. Morfología celular

### 4.3.1. Tinción con azul de toluidina

#### *Fundamento*

El estudio de las alteraciones en la morfología celular son el paso previo al estudio morfológico subcelular. El azul de toluidina (fenotiazin - 5 - io - 3 - amino - 7 - (dimetilamino) - 2 - metil cloruro) es un colorante acidófilo inespecífico que nos permite observar células fijadas y crecidas sobre cubreobjetos de forma rápida y sencilla.

#### *Reactivos*

- Metanol absoluto (Panreac).
- Azul de toluidina (Sigma-Aldrich).
- Agua destilada.

- Xileno (Panreac).
- EuKitt® (Fluka, Alemania).

#### *Procedimiento y observación*

- Los estudios de microscopía óptica de campo claro fueron llevados a cabo en cubreobjetos y para ello, tras la exposición a los xenobióticos, se retiró el medio y se fijaron las células con metanol absoluto a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 7 minutos y se dejaron secar.
- Después, se procedió con la tinción con azul de toluidina 0.025 % (p/v) en agua destilada durante 20 segundos.
- Por último, se realizó un lavado en agua destilada y el montaje de los preparados en EuKitt®, tras dejar secar los cubreobjetos teñidos y realizar una breve inmersión en xileno.

#### 4.4. Marcadores de daño subcelular

Los distintos xenobióticos a los que se ven expuestas las células pueden actuar sobre dianas intracelulares específicas. Por lo tanto, el estudio del daño subcelular es de gran interés, ya que puede aportar información sobre el mecanismo citotóxico del compuesto. Estos análisis se llevaron a cabo tanto sobre células fijadas como con material *in vivo*.

##### 4.4.1. Marcaje supravital con naranja de acridina

#### *Fundamento*

La observación del patrón de distribución de los lisosomas se llevó a cabo *in vivo* mediante un protocolo de marcaje supravital con naranja de acridina (3, 6 – bis (dimetilamino) acridina). Este compuesto presenta unas características físico – químicas que permiten su acumulación en los lisosomas debido al pH ácido de los mismos. La elevada concentración favorece la formación de oligómeros de naranja de acridina, que provocan un efecto metacromático, por lo que los lisosomas luz en el rango del naranja – rojo, mientras que el resto de estructuras citoplasmáticas emiten luz verde cuando se excitan con luz azul (Milot y col., 1997).

#### *Reactivos*

- Naranja de acridina (BDH Chemicals, Reino Unido).
- Medio completo sin suero.
- PBS 1x.

#### *Procesamiento y observación*

- Una vez finalizado el tratamiento deseado, y lavadas las células crecidas en cubreobjetos con tampón fosfato salino 1x, se añadió a cada pocillo una mezcla de naranja de acridina 10  $\mu\text{M}$  en medio de cultivo sin suero.
- Tras una incubación de 8 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se retiró la mezcla, se lavaron las células abundantemente con tampón fosfato salino 1x y rápidamente se procedió a la observación mediante microscopía óptica de fluorescencia empleando un filtro de excitación azul ( $\lambda = 470 - 490\text{ nm}$ ), un filtro de barrera de 520 nm.

### 4.4.2. Marcaje supravital con rodamina 123

#### *Fundamento*

Para estudiar la distribución *in vivo* del retículo mitocondrial de las células Vero en cultivo, se empleó rodamina 123 (2 - (6 - amino - 3 - imino - 3H - xanten - 9 - il) ácido benzoico metil éster). La presencia de una carga deslocalizada junto con su lipofilicidad, permite que este colorante vital se acumule selectivamente en las mitocondrias, gracias al potencial de membrana existente en la membrana mitocondrial interna (Chen, 1988).

#### *Reactivos*

- Rodamina 123 (Sigma-Aldrich).
- Medio completo sin suero.
- PBS 1x.

#### *Procesamiento y observación*

- Tras el tratamiento pertinente, las células crecidas en cubreobjetos se lavaron en tampón fosfato salino 1x y se añadió 1 mL de la mezcla de rodamina 123 (6.5 µg/mL) en medio completo sin suero a cada pocillo.
- La observación se realizó tras 8 minutos de incubación a 37 °C y un triple lavado de las células con tampón fosfato salino 1x, en el microscopio óptico de fluorescencia con un filtro de excitación azul ( $\lambda = 470 - 490$  nm) y un filtro de barrera de 520 nm.

### 4.4.3. Análisis de la morfología nuclear

#### *Fundamento*

El estudio de la morfología nuclear es un parámetro de gran interés en estudios toxicológicos. El marcaje específico de ADN con Hoechst 33258 permite analizar los distintos estados de la cromatina: laxa, fragmentada y/o condensada, entre otras. Hay que indicar que el estudio se llevó a cabo sobre células adheridas y desprendidas del sustrato, procedentes de los estudios de integridad de la membrana plasmática y de adhesión, lo que permitió complementar estos análisis.

#### *Reactivos*

- PBS 1x.
- Tripsina.
- Tripsina-EDTA.
- Medio completo con suero.
- Metanol absoluto (Panreac).
- Hoechst 33258 (Riedel-de Haën®).

#### *Procesamiento y observación*

- La exposición de las células a los diferentes compuestos se realizó en frascos de 25 cm<sup>2</sup>. De ellos se recogió el medio de cultivo con las células flotantes que fueron cuantificadas con el ensayo de azul tripán, que posteriormente se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 r.p.m.
- Se fijó el *pellet* obtenido con metanol absoluto a -20 °C y se guardaron en el congelador. Antes de la visualización, una alícuota se tiñó con Hoechst 33258 1 mg/mL en proporción 1:10.
- Para las células adheridas, se realizó una tripsinización y resuspensión en MCCS, tras la cual se continuó el protocolo exactamente igual que para las células en suspensión.



- La mezcla se observó en un microscopio óptico de fluorescencia con un filtro de excitación ultravioleta ( $\lambda = 360 - 370 \text{ nm}$ ), con un filtro de barrera de 420 nm, procediéndose al recuento de células clasificándolas en diferentes categorías.

#### 4.4.4. Integridad del citoesqueleto de actina

##### *Fundamento*

La estabilidad de los microfilamentos de actina es vital para el mantenimiento de la homeostasis celular. Debido a que la dinámica de este componente del citoesqueleto es muy elevada, las alteraciones observadas por la acción de los xenobióticos pueden resultar muy tempranas, por lo que puede considerarse una estructura centinela.

La potente toxina de *Amanita phalloides*, faloidina, presenta gran afinidad por los microfilamentos de actina, los estabiliza e impide su despolimerización, actuando como ligando específico y permitiendo la visualización microscópica de los mismos al conjugarla con isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC).

##### *Reactivos*

- PBS 1x.
- Formaldehído (Panreac).
- Triton® X 100 (Merck)
- Faloidina conjugada con TRITC (Sigma-Aldrich).
- Albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich).
- Hoechst 33258 (Riedel-de Haën®).
- ProLong® antifade Gold reagent (Molecular Probes Inc., EE. UU.).

##### *Procesamiento y observación*

- Las células crecidas en cubreobjetos tras los diferentes tratamientos, fueron fijadas durante 10 minutos en formaldehído al 10 % (v/v) en PBS 1x.
- Se permeabilizaron con Triton® X 100 al 0.5 % (v/v) en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- La faloidina rodaminada diluida 1:250 desde la concentración comercial en una solución de BSA al 1 % (v/v) en PBS 1x, se incubó 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda.
- Tras lavar tres veces con PBS 1x, se realizó una contratinción de núcleo mediante Hoechst 33258 (5  $\mu\text{g/mL}$ ) y se montaron los preparados con ProLong® antifade Gold reagent.
- La observación de los preparados se llevó a cabo empleando microscopía óptica de fluorescencia con filtro de excitación verde ( $\lambda = 540 - 580 \text{ nm}$ ) para los microfilamentos de actina y ultravioleta ( $\lambda = 360 - 370 \text{ nm}$ ) para los núcleos, con filtros de barrera de 610 y 420 nm respectivamente.

#### 4.4.5. Integridad del citoesqueleto de microtúbulos

##### *Fundamento*

Multitud de xenobióticos son capaces de provocar alteraciones sobre la conformación del citoesqueleto de microtúbulos y sobre la dinámica del huso mitótico. La integridad del citoesqueleto de microtúbulos se puso de manifiesto mediante inmunofluorescencia indirecta para  $\alpha$ -tubulina y contratinción con Hoechst 33258. Para complementar el estudio, los husos mitóticos se analizaron mediante una doble inmunofluorescencia indirecta para citoesqueleto de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -

tubulina, contrateñida con Hoechst 33258, de modo que permitiera el análisis de los microtúbulos del huso mitótico, los centriolos y los cromosomas.

### Reactivos

- Metanol absoluto (Panreac).
- Agua destilada.
- Triton® X 100.
- Albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich).
- PBS 1x.
- Anticuerpo anti- $\gamma$ -tubulina desarrollado en ratón.
- Anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con TRITC.
- Anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina desarrollado en ratón.
- Anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC).
- Hoechst 33258 (Riedel-de Häen®).
- ProLong antifade Gold reagent (Molecular Probes Inc.).

### Procesamiento y observación

- Las células crecidas en cubreobjetos se fijaron con metanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 7 minutos y tras retirar el fijador se dejaron secar al aire.
- Se lavaron en agua destilada, se permeabilizaron durante 10 minutos con Triton® X 100 al 0.5 % (v/v) en PBS 1x y se bloqueó con albúmina de suero bovino en PBS al 5% (v/v) durante otros 10 minutos.
- Se realizaron cuatro incubaciones secuenciales con los distintos anticuerpos, primero  $\gamma$ -tubulina y su secundario anti-ratón conjugado con TRITC y posteriormente  $\alpha$ -tubulina y su secundario anti-ratón conjugado con FITC.
- Los anticuerpos primarios se incubaron durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  y los secundarios se incubaron durante 45 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda y todos a una dilución 1:100 desde la concentración comercial (tabla 4) en BSA/PBS 1x al 1% (v/v).

Anticuerpos			
Nombre	Síntesis	Casa comercial	Concentración comercial
Anti $\alpha$ -Tubulina	Ratón	Sigma	3.8 mg /mL
Anti $\gamma$ -Tubulina	Ratón	Sigma	2.3 mg /mL
Anti-ratón-FITC	Cabra	Sigma	2.0 mg /mL
Anti-ratón-TRITC	Cabra	Sigma	3.9 mg /mL

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en la detección inmunofluorescente de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tubulina.

- Finalmente, se realizó una contratinción para núcleo con Hoechst 33258 (5  $\mu\text{g/mL}$ ) siguiendo el protocolo usual y se montó con ProLong® antifade gold reagent. Cuando la inmunofluorescencia indirecta se realizó sólo contra la  $\alpha$ -tubulina, se procedió de la misma manera sin realizar la primera inmunodetección.
- La observación se realizó en un microscopio óptico de fluorescencia con filtro de excitación azul ( $\lambda = 470 - 490 \text{ nm}$ ) para los microtúbulos, verde ( $\lambda = 545 - 580 \text{ nm}$ ) para los centriolos y ultravioleta ( $\lambda = 360 - 370 \text{ nm}$ ) para los núcleos. El microscopio incorporaba filtros de barrera de longitudes de onda 520, 610 y 420 nm respectivamente.

#### 4.5. Análisis específicos de daño al ADN

La exposición a agentes tóxicos puede provocar respuestas que dañan el ADN, por este motivo se procedió a analizar diferentes biomarcadores de genotoxicidad como los niveles de 8-OHdG, el porcentaje de células con roturas de doble cadena de ADN y la integridad de los cromosomas con Colcemida®.

##### 4.5.1. Inmunodetección de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG)

###### *Fundamento*

Las bases de ADN son especialmente susceptibles a la oxidación mediada por las ERO. El bajo potencial redox de las guaninas hace que estas bases sean particularmente vulnerables y puede transformarlas en diversos productos de guanina oxidada (Burrows y Muller, 1998). Por este motivo, la localización de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) es un parámetro útil y rápido para detección de daño oxidativo al ADN (Yarborough y col., 1996).

###### *Reactivos*

- Acetona (Panreac)
- RNAsa A (Sigma-Aldrich).
- PBS 1x.
- Hidróxido de sodio (Panreac).
- Cloruro de sodio (Panreac).
- Etanol 40 % (Panreac).
- Triton® X 100 (Merck).
- Peróxido de hidrógeno 30 % (Panreac).
- Agua destilada.
- Albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich).
- Anticuerpo desarrollado en ratón anti-8-OHdG (JaICA, Japón).
- Anticuerpo secundario panespecífico biotinilado del kit Histostain® SP (Zymed Laboratories Inc., EE. UU.).
- Estreptavidina-peroxidasa del kit Histostain® SP (Zymed Laboratories Inc.).
- Diaminobencidina (Sigma-Aldrich).
- Eukitt® (Fluka).

###### *Procesamiento y observación*

- Las células crecidas en cubreobjetos y expuestas a los diferentes tratamientos fueron fijadas durante 10 minutos en acetona a 4 °C en placas de Petri de vidrio. Se retiró el fijador y se dejaron secar al aire en la campana extractora de gases.
- Se degradó el ARN de las muestras empleando ribonucleasa A 50 µg/ml en PBS 1x durante 1 hora a 37 °C.
- Tras varios lavados, se incubó la muestra durante 5 minutos a 4 °C con tampón desnaturalizante compuesto por: NaOH 70 mM, NaCl 0.14 M y etanol 40 % (v/v) en agua destilada.
- Se permeabilizó el material durante 5 minutos a 4 °C con Triton® X 100 en PBS 1x al 0.5 % (v/v).
- Durante 15 minutos a 4 °C, se inactivó la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % (v/v) en agua destilada.
- Posteriormente, se realizó un bloqueo a temperatura ambiente con BSA al 5 % (v/v) en PBS 1x durante 10 minutos.

- La incubación con el anticuerpo primario anti-8-OHdG (5 µg/ml) se llevó a cabo durante 18 horas a 4 °C en cámara húmeda.
- Se realizaron dos lavados en PBS 1x, se volvió a permeabilizar con la solución al 0.5 % (v/v) de Triton® X 100 en PBS 1x y se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario panespecífico biotinilado durante 10 minutos a 37 °C en cámara húmeda.
- Se lavó dos veces con PBS 1x y para detectar el anticuerpo secundario se añadió estreptavidina-peroxidasa durante 10 minutos a temperatura ambiente, también en cámara húmeda.
- Tras volver a lavar con PBS 1x, se reveló con diaminobencidina (DAB) 5 mg/mL en PBS 1x durante 3 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. A esta disolución se añadieron 3 gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % (v/v) en en cada 10 mL de agua destilada justo antes de la incubación.
- Finalmente, se lavaron los cubreobjetos, se dejaron secar y posteriormente se montaron en Eukitt®.

### *Análisis de imagen*

La cuantificación de la señal 8-OHdG positiva empleando *ImageJ 1.41o* se realizó siguiendo el protocolo de Tokoyuni y colaboradores (1997):

- Las imágenes de diferentes campos capturados al azar en las mismas condiciones de intensidad de luz, tiempos de exposición y sensibilidad de la cámara, se transformaron a imagen en escala de grises y se procesaron hasta obtener los resultados de intensidad y tamaño de cada núcleo.
- A partir de estos datos, se calculó el índice 8-OHdG según la siguiente ecuación:

$$\text{Índice 8OHdG} = \Sigma ([X - \text{umbral}] \times \text{area } [\mu\text{m}^2]) / \text{número total de células}$$

donde X es la densidad de tinción en escala de grises. El número de partículas por fotografía estaba alrededor de 25 y siempre fue mayor de 10 en todos los casos y al menos se analizaban 10 fotografías por tratamiento procedentes de 3 experimentos independientes. Sobre estos datos de índice 8-OHdG, se calcularon los valores de media y desviación estándar y finalmente realizaron los pertinentes análisis estadísticos.

### 4.5.2. Inmunodetección de la histona H2AX fosforilada

#### *Fundamento*

La fosforilación de la histona H2AX ( $\gamma$ -H2AX) indica una rotura de doble cadena en el ADN, que se puede observar por inmunodetección, lo que se considera actualmente como un biomarcador de gran utilidad y relevancia en el campo del estudio del daño al ADN (Kuo y Yang, 2008).

#### *Reactivos*

- Formaldehído (Panreac).
- Triton® X 100 (Merck).
- Albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich).
- PBS 1x.
- Anticuerpo primario desarrollado en ratón anti- $\gamma$ -H2AX (Upstate®-Millipore™, EE. UU).

- Anticuerpo secundario anti – ratón desarrollado en cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich).
- Hoechst 33258 (Riedel-de Häen®).
- ProLong® antifade Gold reagent (Molecular Probes).

#### *Procesamiento y observación*

- Las células crecidas en cubreobjetos se fijaron con formaldehído en PBS 1x al 10 % (v/v) frío durante 10 minutos.
- Posteriormente, se lavaron en PBS 1x y se permeabilizaron durante 5 minutos con Triton® X 100 al 5 % (v/v) en PBS 1x.
- Se bloqueó con albúmina de suero bovino en PBS al 5% (v/v) durante 10 minutos y se realizó la incubación con anti- $\gamma$ -H2AX durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda, a una concentración 2.0  $\mu$ g/mL.
- Transcurrido el tiempo, se lavó con PBS 1x y se volvió a permeabilizar y a bloquear, incubando el anticuerpo secundario durante 45 minutos a 37 °C, también en cámara húmeda, a una concentración 20  $\mu$ g/mL.
- Finalmente, se realizó una contratinción para núcleo con Hoechst 33258, siguiendo el protocolo usual y se montó con ProLong® antifade Gold reagent.
- La observación y los recuentos de células se realizaron en un microscopio óptico de fluorescencia con filtro de excitación azul ( $\lambda$ = 470 – 490 nm) para la histona y ultravioleta ( $\lambda$ = 360 – 370 nm) para los núcleos. El microscopio incorporaba filtros de barrera de longitudes de onda 520 y 420 nm respectivamente.

#### 4.5.3. Tratamientos con Colcemida®

##### *Fundamento*

El estudio clásico de la integridad de los cromosomas empleando un agente que altera la dinámica del huso mitótico es de gran utilidad en los análisis del daño al ADN, permitiéndonos observar los cromosomas en su grado máximo de condensación.

##### *Reactivos*

- KaryoMAX Colcemid® solution (GIBCO BRL, EE. UU.).
- Medio completo con suero al 1 % (v/v).
- PBS 1x.
- Tripsina.
- Tripsina-EDTA.
- Cloruro potásico (Panreac).
- Etanol absoluto (Panreac).
- Ácido acético glacial (Merck).
- Giemsa 0.4 % (p/v) (Merck).
- Xileno (Panreac).
- Eukitt® (Fluka).

#### *Procesamiento y observación*

- Tras la incubación con el tratamiento deseado, se retiró el medio de cultivo con droga, las células se lavaron con PBS 1x y se volvieron a incubar en esterilidad durante 4 horas en medio completo con suero al 1 % (v/v) que contenía 0.1  $\mu$ g/mL de Colcemida®.

- Transcurrido este tiempo, se procesó el cultivo como se describe anteriormente para la tripsinización. Una vez recogidas las células, se centrifugaron 10 minutos a 1500 r.p.m., se retiró el medio de cultivo y se lavaron en PBS 1x y se volvieron a centrifugar.
- Se eliminó el sobrenadante y se incubaron 20 minutos a 37 °C en una solución de KCl 75 mM.
- Posteriormente se centrifugaron de nuevo y tras eliminar la solución salina, se procedió a la fijación en una mezcla de etanol-acético 3:1 (v/v) frío (4 °C) preparada en fresco y se guardó en nevera, durante al menos una hora.
- Las células se lanzaron sobre un portaobjetos y se dejaron secar al aire a temperatura ambiente. Cuando estuvo totalmente seco, se tiñeron empleando un colorante específico de núcleo y visible en campo claro, Giemsa 2 % (v/v) durante unos 10 minutos a temperatura ambiente.
- Finalmente, la muestra se lavó abundantemente con agua y tras dejarla secar se montó en definitivo con Eukitt®.

### 4.6. Estrés oxidativo

#### 4.6.1. 2', 7'- diclorofluoresceína diacetato

##### *Fundamento*

Una vez que la 2', 7'- diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) se incorpora al citosol, las esterasas eliminan los radicales acetatos, impidiendo su salida de la célula y generando diclorofluoresceína (DCFH). En presencia de especies reactivas de oxígeno, la DCFH se transforma en diclorofluoresceína oxidada (DCF) que es capaz de emitir luz verde tras ser excitada a 485 nm.

En nuestros estudios se siguió protocolo descrito por Wang y Joseph (1999), para cuantificar el estrés oxidativo utilizando placas multipocillo .

##### *Reactivos*

- Medio completo con suero al 1 % (v/v).
- 2', 7'- diclorofluoresceína diacetato (Sigma-Aldrich).
- PBS 1x.

##### *Procesamiento y lectura de los datos*

- Tras exponer a las células a los tratamientos deseados, se retiró el medio con droga y se lavaron los pocillos con PBS 1x abundantemente.
- Se incubaron durante 1 hora en esterilidad con una solución de diclorofluoresceína diacetato (100  $\mu$ M) en medio de cultivo a 37 °C y con atmósfera del 5 % de CO<sub>2</sub>.
- Tras este tiempo se volvieron a lavar los pocillos con PBS 1x y después se leyó la placa de cultivo con 1 mL de PBS 1x en cada pocillo durante 6 ciclos de 5 minutos con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una de emisión de 535 nm, empleando un lector de placas SPECTRAFluor en modo fluorescencia.
- Posteriormente, se procesó la placa con el fin de cuantificar la proteína celular total mediante el método de Bradford descrito anteriormente.
- Con ambos resultados, normalizamos la intensidad de fluorescencia medida por fluorimetría para la DCF y la cantidad de proteína celular de cada pocillo, de modo que obtuvimos valores de incremento de la intensidad de fluorescencia/ $\mu$ g de proteína, que más tarde normalizamos respecto del control.

#### 4.6.2. Dihidroetidina

##### *Fundamento*

La dihidroetidina (2,7-diamino-10-etil-9 fenil- 9,10-dihidrofenantridina) es capaz de descomponerse en etidio en presencia de anión superóxido, por lo que constituye un marcador específico de estrés oxidativo (Carter y col., 1994).

##### *Reactivos*

- Medio con suero al 1 % (v/v).
- Dihidroetidina (Sigma-Aldrich).
- PBS 1x.

##### *Procesamiento y observación*

- Una vez finalizada la exposición a los diferentes tratamientos, se retiró el medio con droga y se lavaron los pocillos con PBS 1x.
- En este momento, las células crecidas en cubreobjetos se incubaron a 37 °C y en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %, durante 30 minutos con dihidroetidina 2.5 µM en medio completo sin suero.
- Transcurrido este tiempo, se lavaron los pocillos con PBS 1x abundantemente y las células vivas marcadas con dihidroetidina se estudiaron en microscopía óptica de fluorescencia utilizando un filtro de excitación verde ( $\lambda = 540-580$  nm) y un filtro de barrera de 610 nm.

#### 4.7. Estudios de adhesión celular

##### *Fundamento*

Cuando las líneas celulares adherentes pierden el correcto anclaje con el sustrato, se activan rutas de señalización que generalmente desembocan en procesos de muerte celular.

Se emplearon células Vero crecidas y tratadas en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, recogiendo por separado las células flotantes y las adheridas al sustrato, para realizar recuentos del número de células empleando un hemocitómetro.

##### *Reactivos*

- PBS 1x.
- Tripsina.
- Tripsina-EDTA.
- Medio completo con suero al 1 % (v/v).
- Azul Tripán 0.4% (Sigma-Aldrich).

##### *Procedimiento y procesamiento de los datos*

- Las células se procesaron siguiendo las instrucciones anteriormente descritas para el ensayo del azul tripán en el apartado de cultivos celulares y manteniendo separadas ambas fracciones del cultivo.
- Para los recuentos se utilizó un microscopio óptico convencional Zeiss 20T. Los porcentajes de células flotantes y adheridas fueron calculados a partir del número total de células presentes en el frasco. Los resultados procedían de un total de nueve recuentos de tres experimentos independientes para cada grupo de dosis. Con todos ellos, se procedió al cálculo del valor medio, la desviación estándar y se llevaron a cabo los análisis estadísticos más adecuados para determinar las diferencias entre las medias de los grupos de estudio.

### 4.8. Análisis de la expresión génica

El análisis de la expresión génica por microarrays es una herramienta de estudio muy potente que permite determinar los cambios en la síntesis de ARN mensajero (ARNm) de multitud de genes simultáneamente. Para ello es preciso realizar un protocolo experimental que se divide en cuatro grandes etapas.

#### 4.8.1. Obtención de ARN total y mensajero

##### *Fundamento*

La expresión de genes se realiza mediante la transcripción de ADN para formar ARNm cuya característica distintiva es la presencia de una secuencia poli(dA) en su extremo terminal. Aprovechando esta particularidad y mediante un método de separación en columnas empleando bolas con secuencias poli(dT) (secuencia complementaria a la secuencia poli(dA)), se pueden aislar del resto de los ARN celulares.

##### *Reactivos*

Los reactivos empleados para la extracción del ARN total y mensajero adquiridos en Sigma-Aldrich fueron cloroformo, isopropanol, acetato de sodio, glucógeno, dietilpirocarbonato (DEPC), el reactivo de aislamiento TRI Reagent® y el kit miniprep ARNm GENELUTE. El etanol utilizado fue de Merck y la agarosa de Laboratorios Conda (España).

##### *Procesamiento*

- Tras recoger las células expuestas a las sustancias a estudio, se retiró el medio por centrifugación (10 minutos, 1200 r.p.m.) y se lavaron las células con PBS 1x. Se volvió a centrifugar, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento obtenido con el reactivo de aislamiento TRI Reagent® (10<sup>7</sup> células/mL), guardándose a -80 °C tras una cuidadosa agitación.

A partir de este momento, se procedió a aislar el ARN total siguiendo el método del fenol-cloroformo descrita por (Chomczynski y Sacchi, 1987).

- La extracción del ARN total comenzó añadiendo 200 µL de cloroformo por cada mililitro de TRI Reagent® y tras agitar las muestras vigorosamente, se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Posteriormente, se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C, formándose tres fases: la inferior orgánica de color rosado que contenía proteínas, otra intermedia blanca donde se hallaba el ADN y por último, la fase superior acuosa e incolora que contenía el ARN.
- La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo al que se añadieron 500 µL de isopropanol por cada mililitro de TRI Reagent®, estas fracciones se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y seguidamente se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C, formándose en el fondo del tubo un depósito de ARN.
- Se retiró el sobrenadante con cuidado y se lavó el sedimento con etanol frío al 75 % (v/v), centrifugándose a continuación durante 5 minutos a 13000 r.p.m. a temperatura ambiente.
- El depósito resultante se dejó secar al aire y se resuspendió finalmente en agua con dietilpirocarbonato 0.1 % (v/v) que está libre de DNAsas y RNAsas.



Este ARN total se cuantificó empleando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale aproximadamente a 40 µg/mL. Además, para determinar su pureza se calculó el cociente  $A_{260}/A_{280}$ , que debía estar próximo a 2 para considerar que el ARN estaba en buenas condiciones. Finalmente se cargó en un gel de agarosa al 1 % para comprobar su integridad.

En este punto, procedimos a purificar el ARN mensajero de las muestras como se indica a continuación:

- En un eppendorf, se incuban durante 3 minutos a 70 °C, 100 µg de ARN total en agua con DEPC, la solución de unión del kit GENELUTE y las bolas con los oligonucleótidos poli(dT).
- A continuación, se deja reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, se centrifuga brevemente y se retira el sobrenadante.
- El sedimento en que se encuentran unidas las bolas poli(dT) y el ARNm se resuspende en la solución de lavado, se transfiere a una columna, se centrifuga durante 2 minutos y se elimina el sobrenadante. Esta operación se realiza dos veces.
- Se retira la columna y se coloca en un tubo nuevo, donde se añaden 50 µL tampón de extracción precalentado a 70 °C, se incuba durante 5 minutos a 70 °C y se centrifuga durante un minuto más, esta operación se lleva a cabo dos veces.
- El ARNm purificado se precipitó con etanol absoluto, acetato de sodio (3:1) y glucógeno durante toda la noche a -20 °C.
- Las muestras se centrifugaron a 15000 g durante 15 minutos a 4 °C, se añadió etanol 75 % (v/v) y se volvió a centrifugar durante 5 minutos.
- Una vez retirado el sobrenadante, se dejó secar a temperatura ambiente. El ARNm se resuspendió en agua con DEPC precalentada y se incubó 5 minutos a 65 °C.
- Tras centrifugar durante un minuto, se cuantificó de nuevo empleando un nanodrop como se describió anteriormente y se comprobó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### 4.8.2. Marcaje de ADN complementario e hibridación en el biochip

##### *Fundamento*

Para realizar la hibridación de las muestras con las secuencias de ADN impresas en el biochip, se realizó la síntesis de ADN complementario (ADNc). Este proceso se llevó a cabo mediante retrotranscripción inversa del ARNm durante la que se incorporaron nucleótidos fluorescentes (dUTPs) marcados con cianinas verdes (Cy3) y rojas (Cy5).

En este momento, las hebras de ADNc que procedían del control estaban marcadas con Cy3 (verde) y las de los cultivos expuestos a tóxicos con Cy5 (rojo). Estas secuencias se hibridaron en el biochip y durante este proceso ambos tipos de hebras se anclaron a sus complementarias. Los genes que vieron reprimida su expresión tras el tratamiento, mostraron en el biochip fundamentalmente el color verde del control. Por el contrario, aquellos genes cuya expresión estaba aumentada en respuesta al xenobiótico mostrarán, predominantemente el color rojo con el que se marcó la muestra problema.

El biochip utilizado para el estudio es el *CholestChip*<sup>TM</sup> (Biotoools B&M Labs. S.A., España), un microarray especialmente diseñado por el Dr. Javier Martínez-Botas (Laboratorio de Microarrays del Servicio Bioquímica-Investigación del Hospital Ramón y Cajal) para el estudio del metabolismo de lípidos, ciclo celular, farmacogenómica y ensayos con xenobióticos. Contiene 319 secuencias génicas humanas con tamaños entre 0.4 y 1.0 Kbases que fueron seleccionadas a partir de la base de datos I.M.A.G.E Consortium y se obtuvieron de OpenBiosystems. Su desarrollo se debe al interés por determinar las relaciones que existen entre la obesidad y los problemas de metabolismo y ciclo celular, además de describir los efectos que presentan diferentes fármacos reguladores lipídicos sobre la expresión génica.

El microarray está impreso en cristales de aminosilano empleando un robot de impresión SpotArray<sup>TM</sup> 72 (Perkin Elmer Inc., EE. UU.) y tiene un diseño de impresión que distribuye triplicados en dos coordenadas distintas del *array*, de manera que cada sonda se imprimió seis veces, permitiendo comprobar la reproducibilidad de la prueba. El ADN se fijó al soporte mediante una irradiación de luz ultravioleta 300 mJ (GS GEN LINKER<sup>TM</sup>, BioRad, EE. UU.) y una incubación durante 2 horas a 80 °C.

En nuestro caso, el *CholestChip*<sup>TM</sup> es una herramienta única, ya que al trabajar con una línea celular establecida de un mamífero del que se desconocen por completo las secuencias génicas, sólo podemos acceder a una información tan completa de sus cambios de expresión con un microarray que presente secuencias de gran tamaño y que estén relativamente cercanas filogenéticamente.

### Reactivos

Los reactivos RT SuperScript II, di-tio-tritol (DTT), tampón de replicación 5x y Cot-1 DNA<sup>®</sup> se obtuvieron de Invitrogen (EE. UU.). Los cebadores aleatorios (*random primers*), los oligo dT y el inhibidor de RNAsas que se utilizaron eran de Promega (Promega Co., EE. UU.). Cy3-dUTP, Cy5-dUTP, las columnas de purificación de ADN del kit Illustra CyScribe GFX y las sondas control Lucidea<sup>TM</sup> *spike mix* procedían de Amersham-GE Healthcare (Reino Unido). El tampón tris-HCl, EDTA, BSA, DEPC y las bolas poli(dA) provenían de Sigma-Aldrich. El hidróxido de sodio era de Panreac y los desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) fueron comprados a Applied Biosystems (EE. UU.). Para la hibridación se empleó el tampón del kit de hibridación de Perkin Elmer (EE. UU.) y para los lavados finales ArrayIt<sup>®</sup> Wash buffers (A, B y C) (Arrayit<sup>®</sup> Co., E.E.U.U.).

### Procesamiento

Se empleó el protocolo de Aldamassi y colaboradores (2001), con las modificaciones del Laboratorio de Microarrays del servicio de Bioquímica-Investigación del Hospital Ramón y Cajal.

- En un tubo eppendorf, se mezclaron 1 µg de ARNm con oligonucleótidos dT (0.5 µg/µL), los cebadores aleatorios (0.5 µg/µL) y de las sondas control (*spikes mix*) en presencia de agua con DEPC 0.1 % (v/v) durante 10 minutos a 70 °C en el termociclador Peltier Thermal Cycle, PTC-200 (MJ Research, EE. UU.). El programa finalizó manteniendo las muestras a 4 °C.
- A continuación, se añadieron tampón de replicación 5x, 10 mM de DTT y una disolución con todos los desoxinucleótidos en agua con DEPC. Se añadió un inhibidor de RNAsas (30 U) y los dUTP marcados con Cy3 para el control y Cy5 para las muestras y por último la transcriptasa inversa

SuperScript II (14 U) y se incubaron a 42 °C durante 2 horas en el termociclador.

- Posteriormente se procedió a la degradación del ARNm empleando EDTA e hidróxido de sodio durante 30 minutos a 65 °C, también en el termociclador.
- La muestra se dejó enfriar a 4 °C y se añadió tampón tris-HCl 1 M (pH 7.5), procediendo a purificar el ADNc en columnas GFX, combinando las muestras control (Cy3) con las muestras test (Cy5).
- Tras la purificación, se añadió a las mezclas 0.4 µg poli(dA) y 0.08 µg de Cot-1 DNA® y se secaron en un liofilizador Speed Vacuum SPD121P (Termo Electron Co., EE. UU.).
- El biochip se bloqueó durante 15 minutos a temperatura ambiente con albúmina de suero bovino al 1 % (p/v) en agua precalentada a 50 °C, se lavó con agua bidestilada hirviendo durante 5 minutos y se fijó durante 2 minutos en etanol 96 %. Finalmente, se secó el cristal con una bomba de aire.
- Finalmente, las muestras liofilizadas se resuspendieron en 20 µL de tampón de hibridación durante 3 minutos a 50 °C y tras un pulso en la centrífuga, se cargó la muestra sobre el biochip y se montó con un cubreobjetos. El microarray se incubó en una cámara de hibridación que se introdujo en un baño termostatzado durante toda la noche a 50 °C.
- Transcurrido este tiempo, se retiraron los cubreobjetos de los soportes por inmersión y se mantuvo el biochip en la solución de lavado A (1x) durante 5 minutos en agitación. A continuación se procedió del mismo modo con las soluciones B y C.
- Para concluir, se lavó con agua bidestilada y se secó con una bomba de aire, tras lo cual se procedió a la lectura de la muestra.

#### 4.8.3. Cuantificación de la expresión génica y análisis de los patrones de expresión

Tanto la lectura como el análisis de los resultados de un microarray requieren de un equipamiento específico acoplado a potentes herramientas informáticas que permiten evaluar los cambios de expresión génica en el contexto del biochip al completo.

##### *Procesamiento y lectura de los datos*

- Tras procesar el microarray, se introduce en un escáner de lectura ScanArray (Perkin Elmer). Los valores medios de intensidad de fluorescencia de cada canal (Cy3-verde y Cy5-rojo) y para cada sonda fueron calculados automáticamente por el programa *ScanArray Express 3.0* (Perkin Elmer). Se genera una hoja de datos que se guarda en dos formatos: *spreadsheet.csv*, para poder utilizarla en este programa y otra más universal con extensión *.gpr*, que permite abrir los datos en programas de análisis más potentes, como es el caso de *GEPAS*.
- Los datos de la localización exacta de cada punto en el biochip se guardan en el documento *archivo.gal*.

El software *GEPAS* permite el siguiente paso del proceso de análisis: la normalización.

- El análisis se realiza *on line* en el enlace <http://gepas3.bioinfo.cipf.es/>, concretamente utilizamos la aplicación *Herramientas de normalización*,

donde los datos de intensidad *.gpr* se corrigieron por sustracción del fondo y se normalizaron por global LOWESS.

- Los datos normalizados se filtraron para eliminar los datos de las sondas control (*spikes mix*), así como los datos con intensidad por debajo de los límites de confianza y las réplicas inconsistentes. Tras estos procesos se calculó el ratio Cy5/Cy3 para cada gen. En todos los casos, se consideraron cambios de expresión génica significativos aquellos que mostraron ratios Cy5/Cy3 mayores de 1.75 ( $\log_2 0.8$ ) y menores de 0.57 ( $\log_2 -0.8$ ).
- Finalmente, obtuvimos el archivo denominado *partial\_array.txt*, que es el que se emplea para realizar representaciones y otros análisis.

Para la creación de mapas de rutas metabólicas en las que participan los genes alterados de nuestras muestras, el *partial\_array.txt* se introduce en otro programa de análisis *on line* que tiene la Universidad Tecnológica de Graz (Austria) en el siguiente enlace: <https://pathwayexplorer.genome.tugraz.at>

- Tras cargar el *partial\_array.txt* en su plataforma, se selecciona una base de datos genómica del organismo modelo y aparece un listado de plantillas de rutas de señalización en los que se introducen los datos de nuestro experimento. Obteniéndose de este modo un esquema funcional fácilmente interpretable de los cambios de expresión génica.

Por último, empleamos otro programa de presentación de resultados para el microarray, *MultiExperiment Viewer 4.0* (TM4 Software Development Team). Este software nos permitió, a partir del *partial\_array.txt*, construir diferentes diagramas de colores por columnas que relacionan los genes analizados según criterios estadísticos basados en distancias euclídeas, permitiéndonos entender el proceso de expresión génica de modo global y así definir patrones de expresión.

#### 4.8.4. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

##### *Fundamento*

La reacción en cadena de la polimerasa en modo cuantitativo a tiempo real (RT-qPCR) es una técnica de rutina con una elevada sensibilidad a la hora de medir variaciones en la expresión génica. En estos momentos, representa un ensayo complementario al microarray, ya que el estudio desarrollado en el biochip se considera semicuantitativo y con ésta técnica se realiza la validación de los resultados.

La prueba consiste en la amplificación de secuencias de ADN complementario con incorporación de una marca fluorescente para su posterior cuantificación, lo que permitirá determinar el nivel de expresión génica respecto a un control para una secuencia concreta.

##### *Reactivos*

Promega (EE. UU.) suministró el tampón m-MLV RT 5x, la enzima m-MLV RT, oligo dT, los cebadores aleatorios y el inhibidor de RNAsas. Los desoxinucleótidos (dNTPs) se adquirieron en Applied Biosystems y el kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I de Takara (Japón), que contenía FastStart (Enzima+SYBR Green+Mezcla de reacción), cloruro de magnesio y agua de PCR. El dietilpírocarbonato y los cebadores (tabla 5) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

Nombre del gen	Secuencia cebadora	
	Sentido	Antisentido
<b>CDKN1B</b>	CTGCAACCGACGATTCTTCTACT	GGGCGTCTGCTCCACAGA
<b>CDKN2A</b>	CATAGATGCCGCGGAAGGT	TCCGAGACTCTTTGGAGCCC
<b>CDKN2C</b>	GGAGCCACAAATCTTCAATAAACG	GTCAGGAGAGCTACTCAGTTAATTGATAAA
<b>CDC20</b>	GCCCACCAAGAAGGAACATC	TTTTCCTACTGAGCCGAAGGA

Tabla 5. Cebadores utilizados en la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real.

#### Procesamiento y lectura de los datos

- La reacción de retrotranscripción se inició a 70 °C durante 5 minutos en un termociclador con 50 ng de ARNm y los cebadores
- Posteriormente, se incubó 1 hora a 37 °C en presencia de 200 U de transcriptasa inversa (m-MLV-RT), de los dNTPs 0.5 M, de 30 U de RNAsin y 20 µg/mL de oligo dT.
- La PCR cuantitativa se llevó a cabo con 2 µL de FastStart, 2 µL de ADNc diluido 1:100 y 2 µL de una solución que contenía 4 µM de cada pareja de cebadores en un volumen final de 10 µL.
- La amplificación se inició con una desnaturalización por temperatura (95 °C) durante 10 segundos y el proceso continuó con 40 ciclos de amplificación de 95 °C durante 3 segundos y 60 °C durante 40 segundos.
- Finalmente, se realizó un último ciclo de 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 minuto, 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 15 segundos para conocer las curvas de disociación.
- Los datos de expresión relativa del gen se obtienen calculando el incremento CT ( $\Delta CT$ ) corregido por la eficiencia del gen y normalizado por el *housekeeping* RPLP0 (Gen de la proteína ribosomal mayor).
- El cálculo del incremento CT se realiza con las siguiente fórmula:  $\Delta CT = (n^{\circ} \text{ de ciclo en que la curva de amplificación de la muestra problema se vuelve exponencial}) - (n^{\circ} \text{ de ciclo en que la curva de amplificación de la muestra control se vuelve exponencial})$ .

#### 4.9. Western Blot

##### Fundamento

La expresión génica medida como transcripción de ARN mensajero no siempre es un reflejo directo de la síntesis de proteínas. Además, hay que señalar que las proteínas son las efectoras de las respuestas celulares y por lo tanto su cuantificación es necesaria para poder concluir que los cambios que sufre un gen están relacionados con la respuesta al tóxico.

La técnica de Western Blot es un método muy eficaz de identificación y cuantificación de proteínas, que se basa en la separación según su peso molecular mediante una electroforesis en un gel de acrilamida. Posteriormente, se transfieren a membranas de nitrocelulosa y más tarde sobre ellas, se realizan inmunodetecciones específicas para polipéptidos concretos que permiten además su cuantificación realizando análisis de imagen densitométricos.

##### Reactivos

La albúmina de suero bovino, el cloruro de sodio, el Tween 20, la glicina, el persulfato amónico y todos los reactivos del tampón de lisis (tabla 6) procedían de Sigma-Aldrich, salvo el cloruro potásico (Panreac), el inhibidor de proteasas (Calbiochem, EE.UU.) y el Nonidet P40 (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania).

Tampón de lisis	
Compuesto	Concentración
Antipafina	10 mg/L
Aprotinina	40 mg/L
Benzamidina	1 mM
Cloruro potásico	120 mM
Di-tio-tritol	1 mM
EDTA	1 mM
EGTA	2 mM
Fluoruro de sodio	100 mM
Inhibidor de proteasas	1 mM
Leupeptina	1 mg/L
Molibdato sódico	20 mM
Nonidet P40	0.5 % (v/v)
Ortovanadato sódico	2 mM
Tris-HCl	20 mM
Tritón® X 100	0.1 % (v/v)
β-glicerofosfato	20 mM

Tabla 6. Composición del tampón de lisis empleado en la técnica de western blot.

La mezcla de acrilamida/bisacrilamida 40 % 37.5:1 (2.6 % C), el N,N,N',N'-tetrametiletilen-diamino (TEMED) y el kit de quimioluminiscencia Immun-Star HRP que contenía luminol y tampón de la peroxidasa fueron comprados a BioRad Laboratories Inc. El colorante rojo Ponceau, el docecilsulfato sódico y el isobutanol procedían de Merck. El kit de cuantificación de proteína BCA™ Protein Assay kit fue comprado a Thermo Scientific (EE. UU.). El metanol era Panreac y la leche desnatada en polvo de Central Lechera Asturiana (España). Se emplearon dos marcadores de peso molecular: Rainbow™ Molecular Weight Markers (Amersham-GE Healthcare) y Precision Plus protein™ Dual color Standart (BioRad Laboratories Inc.). Los anticuerpos primarios y secundarios procedían de diferentes casas comerciales que se detallan en la tabla 7.

Anticuerpos primarios				
Nombre	Peso molecular de la proteína detectada (KDa)	Síntesis	Casa comercial	Concentración
p53	53	Ratón	BD Pharmingen™ (EE. UU.)	0.5 µg/mL
p21	21	Conejo	BD Pharmingen™ (EE. UU.)	0.5 µg/mL
Polo-like kinasa (PLK1)	66	Conejo	Santa Cruz Lab. (EE. UU.)	0.2 µg/mL
Ciclina E (CCNE)	53	Ratón	Santa Cruz Lab. (EE. UU.)	0.2 µg/mL
γ-Tubulina	48	Ratón	Sigma (EE. UU.)	2.3 µg/mL
Anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa				
Nombre	Peso molecular de la proteína detectada (KDa)	Síntesis	Casa comercial	Concentración
Anti-ratón	-	oveja	Amersham Biosciences (Reino Unido)	0.2 µg/mL
Anti-conejo	-	burro	Amersham Biosciences (Reino Unido)	0.2 µg/mL

Tabla 7. Anticuerpos utilizados en los estudios de western blot.

#### Procesamiento y lectura de datos

- Tras incubar las células el tiempo deseado con la(s) sustancia(s) química(s) a evaluar, se levantaron las células del sustrato empleando un rascador y se recogió el cultivo.
- Las células se resuspendieron en su propio medio de cultivo, se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 r.p.m. y se desechó el medio antes de lavar en 1 mL de PBS 1x y se volvieron a centrifugar.
- Tras eliminar el PBS 1x, se añadieron 100 µL de tampón de lisis por cada 10<sup>7</sup> células.

- La muestra se cuantificó empleando el kit *BCA Protein Assay* de cuantificación de proteínas siguiendo sus especificaciones técnicas.
- Tras 30 minutos a 37 °C en oscuridad, se procede a la lectura en lector de placas SPECTRAFluor en modo: Fotométrico (Absorbancia)  $\lambda = 540$  nm. A partir de estos datos, se calculó el volumen de muestra necesario para cargar 50 µg de proteína en cada carril.
- Se preparó un gel de acrilamida con dos partes: la porción separadora en la parte baja con Tris-HCl 1 M a pH 8.8 y al 12 % de acrilamida y otra en la parte superior con Tris-HCl 1M pH 6.8 y al 5 % de acrilamida, que se denomina gel concentrador.
- Las muestras se prepararon para la electroforesis, mezclándose con el tampón de carga y se incubaron durante 5 minutos a 100 °C en un termoblock Stuart® SBH 130D.
- La electroforesis se llevó a cabo en un tampón que contenía tris-glicina 1x y SDS 1 % (p/v) en agua bidestilada durante 2 horas a 100 V, a temperatura ambiente.
- La transferencia de las proteínas desde el gel a la membrana de nitrocelulosa se realizó en una cubeta con tampón de transferencia (tampón Tris-Glicina 1x + metanol absoluto 20 % (v/v) en agua bidestilada) durante 1 hora a 100 V en cámara fría.
- La presencia de bandas en la membrana se comprobó mediante tinción con rojo Ponceau.
- Tras lavar la membrana, se bloqueó con suero de bloqueo (lactoalbúmina al 10 % (v/v) en TBS-Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante, la membrana se incubó con el anticuerpo primario en suero de bloqueo (1 % (v/v)) durante toda la noche en cámara fría en agitación.
- El procesamiento continuó con la retirada del anticuerpo y tres lavados de la membrana durante 10 minutos cada uno con TBS-Tween 20 en agitación.
- La inmunodetección de la proteína concluye con la incubación durante una hora a temperatura ambiente del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y el triple lavado en TBS-Tween 20.
- El revelado del marcaje con anticuerpo se realizó con el luminol del kit Immun-Star HRP en cámara oscura, utilizando películas ultrasensibles Amersham Hyperfilm™ ECL (Amersham-GE Healthcare). La película se expuso a la membrana con el líquido revelador el tiempo necesario para que la señal sea limpia y clara.
- Finalmente, el revelado de la película se realizó en la reveladora FPM100A (Fujifilm, Japón).
- El control de carga,  $\gamma$ -tubulina, se detectó en las mismas membranas tras lavarlas con glicina 1 M pH 3 durante 40 minutos a 50 °C para eliminar la actividad peroxidasa.
- El análisis densitométrico de las bandas de proteína se realizó empleando el programa de análisis de imagen Image Quant TL (Amersham Biosciences, Reino Unido) tras escanear las películas en un escáner EPSON PERFECTION 2450 PHOTO.
- Los datos de cantidad de proteína fueron relativizados respecto al control de carga ( $\gamma$ -tubulina). Posteriormente, los datos fueron normalizados respecto a su tratamiento control sin droga representando el número de veces que estaba expresada la proteína respecto a su control en tanto por uno.

- Se realizaron al menos tres experimentos independientes para la obtención de la proteína de cada tratamiento. Las muestras fueron analizadas al menos dos veces para cada proteína estudiada. Finalmente, con todos los datos se calcularon media y desviación estándar y se realizaron los análisis estadísticos oportunos.

### 5. Microscopía

Los estudios de microscopía fueron realizados empleando un microscopio óptico Olympus BX – 61 (Olympus, Japón) motorizado en el eje Z y equipado con:

- Objetivos secos: 10x (fase 1, AN 0.3), 20x (fase 1, AN 0.5) y 40x (fase 2, AN 0.75).
- Objetivos de inmersión: 60x (fase 3, AN 1.4) y 100x (fase 3, AN 1.4).
- Octobar: 1x, 1.25x, 1.6x y 2x.
- Lámpara de mercurio HBO de 100W.
- Filtros de excitación: ultravioleta ( $\lambda=360 - 370$  nm), azul ( $\lambda=470 - 490$  nm), verde ( $\lambda=540 - 580$  nm).
- Filtros de emisión: azul ( $\lambda=420$  nm), verde ( $\lambda=515$  nm), rojo ( $\lambda=610$  nm).
- Tecnología de microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) o Nomarski.

Las imágenes digitales fueron capturadas con el programa *Olympus DP Controller 1.1.1.65*, 2002 (Olympus), que controlaba la cámara digital CCD Olympus DP – 70. El procesamiento de las imágenes se realizó empleando diferentes programas informáticos como *Adobe Photoshop 8.0* (Adobe Systems Inc., EE. UU.), o *ImageJ 1.41o* (National Institutes of Health, EE. UU.), según los requerimientos de cada análisis.

### 6. Análisis estadísticos

Los ensayos de citotoxicidad basal (método de Bradford, reducción del MTT e incorporación de rojo neutro) se llevaron a cabo en placas multipocillo, realizándose como mínimo 3 experimentos independientes y obteniéndose al menos 10 valores medios por grupo de dosis.

En el caso de los experimentos que analizan tasa de división, índice de fases, tipos de metafases, morfología nuclear y frecuencia de células con roturas de doble cadena de ADN, se obtuvo un número muestral mínimo de 6 para cada tratamiento, procedentes de al menos tres experimentos independientes.

Los análisis estadísticos realizados sobre los recuentos de células empleando el ensayo de exclusión de azul tripán presentaron un  $n \geq 9$ , que procedía de tres experimentos independientes.

Los análisis de imagen llevados a cabo para cuantificar la oxidación de bases analizaron diez fotografías procedentes de al menos tres experimentos independientes para cada tratamiento estudiado ( $n \geq 30$ ).

Los estudios de microarray se llevaron a cabo con muestras de al menos tres experimentos independientes para cada grupo de tratamiento, obteniéndose los valores medios a partir de los 6 puntos que presentaba el biochip.

En el caso del western blot, el experimento de cada grupo de dosis fue repetido al menos tres veces obteniéndose suficiente muestra como para analizar cada proteína dos veces, de modo que se consiguió un  $n \geq 6$ .



Como norma general, para la representación gráfica de los valores medios y su desviación estándar de las medidas independientes, cada punto individual se transformó en el porcentaje respecto a los valores obtenidos en el cultivo control. Para los cálculos de media y desviación estándar y sus representaciones gráficas se empleó el programa *Microsoft® Office Excel® 2007* (Microsoft Corporation, EE. UU.).

Los análisis estadísticos comenzaron con la exploración descriptiva de los resultados obtenidos. Para ello, se llevó a cabo un estudio sobre normalidad y homogeneidad de varianzas, de modo que se pudiera garantizar que el empleo de herramientas estadísticas paramétricas era correcto. En este caso, empleamos dos paquetes informáticos *SPSS 11.5.1 para Windows* (SPSS Incorporated, EE.UU.) y *Statistica AX 5.5* (StatSoft® Incorporated, EE.UU.).

Los estudios de normalidad se llevaron a cabo empleando un análisis gráfico de *Normal probability plot (Q-Q plots)*, donde se representan los residuos de los casos observados frente a los residuos normales esperados según el modelo. En esta prueba se consideró que la variable analizada presentaba distribución normal, cuando la nube de puntos creada coincidía con una línea recta. El test de Levene ( $p \leq 0.05$ ) determinó si las variables presentaban homocedasticidad de varianzas.

En caso de que las muestras de cada parámetro no cumplieran estos dos requerimientos, se transformaron utilizando las herramientas más habituales en estos casos: transformación logarítmica, raíz cuadrada o Box-Cox. Finalmente, bien desde la variable transformada o sin transformar, se procedió a aplicar las herramientas estadísticas pertinentes empleando *SPSS 11.5.1 para Windows*.

- Para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de dos grupos de tratamiento, empleamos la t-Student para dos muestras independientes con dos colas ( $\alpha = 0.05$ ).
- En los estudios en los que comparamos más de dos grupos de tratamiento se utilizó un análisis de la varianza unifactorial (ANOVA unifactorial) con un test de comparaciones múltiples *a posteriori* (test *post hoc* de Bonferroni) ambos con un valor de confianza del 95 %.
- El test de la t-Student para una muestra ( $\alpha = 0.05$ ) se usó para comparar una muestra frente a un valor fijo y único (valor de referencia). De este modo, comparamos los valores predichos por los modelos con los obtenidos mediante trabajo experimental.
- En determinados momentos del estudio, hubo que determinar si distintos parámetros mostraban diferencias en su sensibilidad, para lo que se llevaron a cabo análisis estadísticos de comparación de medias, bien empleando t-Student para dos grupos, o bien ANOVA con Bonferroni. Además, también realizamos un análisis de correlaciones para estudiar la asociación entre diferentes parámetros. En todos estos casos, empleamos un análisis de correlaciones bivariadas parciales en los que se estableció el valor r y su nivel de significación con un p-valor de 0.0001.

Finalmente, en los casos en los que se consideró relevante, se estimaron los valores de concentración sin efecto (NOEC), los que producían el menor efecto observado (LOEC) y los que causaban un 50 % de efecto (EC<sub>50</sub>). Para NOEC y LOEC se emplearon los resultados obtenidos por el test de la varianza unifactorial (ANOVA) y su estudio *post hoc*. El cálculo del EC<sub>50</sub> se realizó empleando distintas técnicas de regresión con el programa *Funciones para Windows 2.7.60* (Toti PM Software, España).

### 7. Análisis matemático del efecto combinado

#### 7.1. Efecto observado

En algunos casos, los estudios de predicción del efecto combinado requieren un cambio en la variable dependiente (viabilidad o proliferación), ya que hay que transformarla en efecto observado. Dicho efecto lo podemos definir como la diferencia de la viabilidad o proliferación media del control y la producida por un tratamiento concreto.

$$E_i = (V_c) - (V_x)_i$$

$$E_i = (P_c) - (P_x)_i$$

Donde  $E_i$  es el efecto observado para cada suceso independiente;  $(V_c)$  o  $(P_c)$  es la viabilidad o la proliferación media obtenida en los cultivos control; y  $(V_x)_i$  o  $(P_x)_i$  representa la viabilidad o la proliferación de cada uno de los  $i$  sucesos independientes que se obtienen en los tratamientos. Por último, se calcula el efecto medio para cada grupo experimental. En este caso los cultivos control presentarán un efecto medio de valor cero y los cultivos con una respuesta de efecto máximo tendrán un valor de 100.

#### 7.2. Modelización matemática

Se han empleado los diferentes modelos matemáticos que se citan a continuación, de acuerdo con las recomendaciones de diferentes autores y de la Sociedad de Toxicología estadounidense:

- Aditividad de respuestas.
  - Modelo de correlación positiva completa.
  - Modelo de correlación negativa completa.
  - Modelo sin correlación.
  - Modelo sin correlación modificado.
- Isoblograma.
- Principio de aditividad de Loewe.
- Análisis de pendientes.

Estas herramientas han sido detalladas pormenorizadamente en el apartado de resultados correspondiente de análisis del efecto combinado, para facilitar la comprensión matemática de los modelos con el desarrollo de cada caso.





## Resultados



## 1. Evaluación de citotoxicidad individual

Las pruebas cuantitativas se realizaron tras 24 horas de exposición a butilhidroxianisol en el rango de concentración de 1 a 300  $\mu\text{M}$  y de propilparabeno de 50 a 500  $\mu\text{M}$ . Estos estudios incluyen ensayos de viabilidad y de proliferación. Las pruebas cualitativas se realizaron a diferentes dosis, con el fin de estudiar los cambios morfológicos generales que inducía cada compuesto por separado, mediante tinción con azul de toluidina.

El **butilhidroxianisol** mostró una respuesta citotóxica dependiente de dosis. Todos los ensayos bioquímicos mostraron una tendencia idéntica (figura 9). La integridad de las membranas celulares y el contenido de proteína celular total (CPT) sólo se vieron alterados con respecto al control tras la exposición a la dosis más elevada (300  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, el metabolismo oxidativo (MTT) se vio afectado con tratamientos  $\geq 100$   $\mu\text{M}$ .

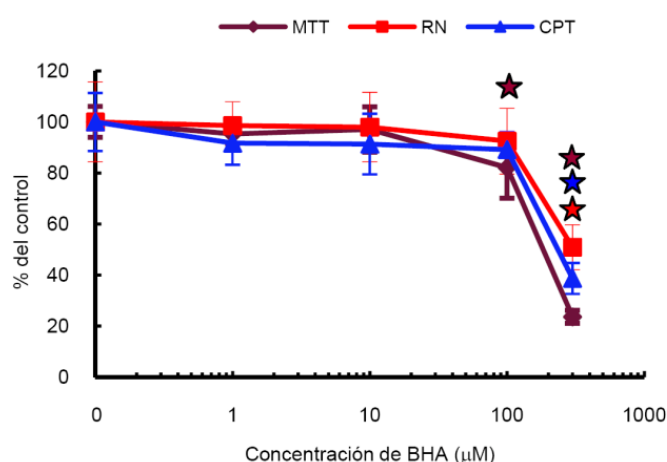


Figura 9. Resultados obtenidos con los tres ensayos de citotoxicidad basal tras 24 horas de exposición a BHA. Las estrellas indican concentraciones que muestran efectos estadísticamente significativos con respecto al control (ANOVA y *post hoc* Bonferroni,  $p \leq 0.05$ ).

El parámetro más sensible de los ensayos fue la tasa de división del cultivo, basada en recuentos del índice mitótico (tabla 8). El porcentaje de células en mitosis mostraba un notable descenso desde la concentración de 1  $\mu\text{M}$ , dosis para la que ningún otro ensayo indicó alteraciones significativas. La tasa de división se redujo a la mitad del valor del control ( $\text{EC}_{50}$ ) a la concentración de 63.8  $\mu\text{M}$ . Por otro lado, la tasa de proliferación fue prácticamente nula en los tratamientos con BHA 300  $\mu\text{M}$  tras 24h de exposición.

Índice mitótico (% del control)				
Control	BHA 1 $\mu\text{M}$	BHA 10 $\mu\text{M}$	BHA 100 $\mu\text{M}$	BHA 300 $\mu\text{M}$
100.0 ± 18.5	76.7 ± 5.2*	71.3 ± 7.9*	44.8 ± 14.2*	5.7 ± 4.9*

Tabla 8. Tasa de división celular de los cultivos de células Vero expuestos durante 24 horas a BHA. Los asteriscos indican valores estadísticamente significativos con respecto al control (ANOVA y *post hoc* Bonferroni,  $p \leq 0.05$ ).

Teniendo en cuenta que las pruebas de viabilidad presentaban una correlación estadísticamente significativa con la cuantificación de la proteína celular total (MTT-CPT,  $r=0.83$ ; RN-CPT,  $r=0.63$ ;  $p<0.0001$ ) y que el test más sensible fue el recuento de índice mitótico, estimamos que el butilhidroxianisol produce un claro efecto antiproliferativo sobre las células Vero y presenta cierta preferencia en su acción tóxica sobre la mitocondria.

## Resultados

Este conjunto de pruebas cuantitativas fueron complementadas con estudios de la morfología celular general empleando microscopía óptica de campo claro. Los cultivos tratados con BHA y teñidos con azul de toluidina no mostraron alteraciones evidentes, salvo tras una exposición a 300  $\mu\text{M}$ , donde se observó una severa vacuolización citoplasmática (figura 10).

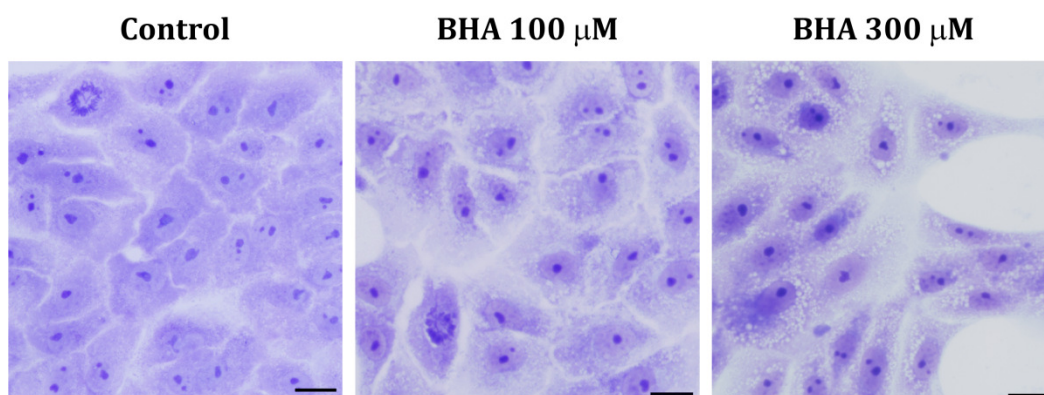


Figura 10. Estudio de morfología celular general mediante microscopía de campo claro y tinción con azul de toluidina de los cultivos expuestos a BHA durante 24 h. Barra 20  $\mu\text{m}$ .

Para evaluar la citotoxicidad basal del **propilparabeno** se utilizó la misma batería de ensayos. Los efectos observados también mostraron una clara respuesta dependiente de dosis (figura 11). El propilparabeno provocó cambios respecto al control en la incorporación de rojo neutro a partir de 200  $\mu\text{M}$ . En este mismo punto, el contenido de proteína celular total fue significativamente menor que en los cultivos no tratados. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas con respecto al control en la reducción del MTT hasta la concentración de 400  $\mu\text{M}$ .

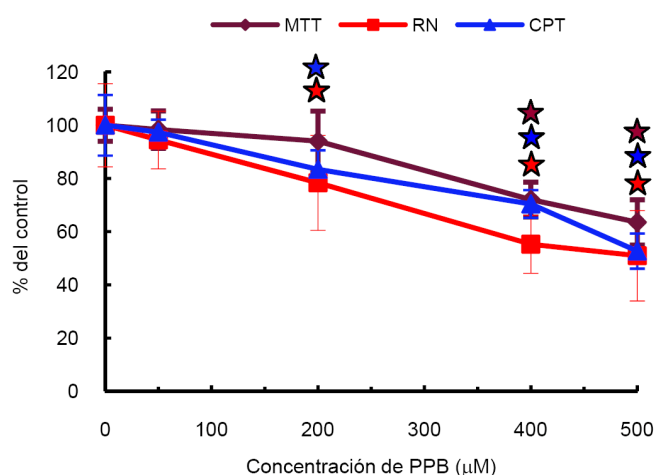


Figura 11. Resultados obtenidos con los tres ensayos de citotoxicidad basal tras 24 horas de exposición a PPB. Las estrellas indican concentraciones que muestran efectos estadísticamente significativos con respecto al control (ANOVA y *post hoc* Bonferroni,  $p \leq 0.05$ ).

Como había ocurrido con el butilhidroxianisol, los recuentos de índice mitótico fueron el parámetro más sensible de todos los analizados con un  $\text{EC}_{50}$  de 159.6  $\mu\text{M}$ , obteniéndose descensos significativos de proliferación, desde la menor dosis evaluada (tabla 9).



Índice mitótico (% del control)				
Control	PPB 50 $\mu$ M	PPB 200 $\mu$ M	PPB 400 $\mu$ M	PPB 500 $\mu$ M
100.0 $\pm$ 24.8	74.2 $\pm$ 15.3*	42.4 $\pm$ 0.1*	30.6 $\pm$ 18.0*	24.0 $\pm$ 6.9*

Tabla 9. Tasa de división celular de los cultivos de células Vero expuestos durante 24 horas a PPB. Los asteriscos indican valores estadísticamente significativos con respecto al control (ANOVA y *post hoc* Bonferroni,  $p \leq 0.05$ ).

Los ensayos de viabilidad y la cuantificación de proteína presentaron una correlación estadísticamente significativa (MTT-CPT,  $r=0.84$ ; RN-CPT,  $r=0.77$ ;  $p < 0.0001$ ). Sin embargo, el compuesto presenta una acción preferente sobre las membranas celulares, como indica la mayor sensibilidad del ensayo de captura de rojo neutro.

Las tinciones con azul de toluidina en células expuestas a diferentes tratamientos de propilparabeno, no mostraron alteraciones morfológicas reseñables, incluso a la dosis más alta ensayada (figura 12).

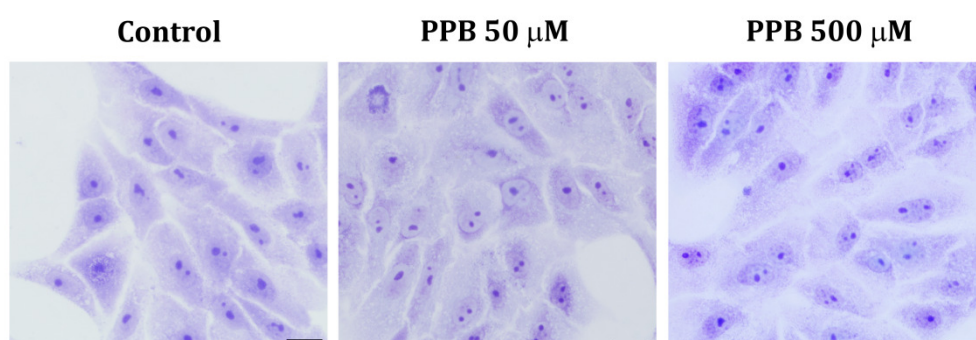


Figura 12. Estudio de morfología celular general mediante microscopía de campo claro y tinción con azul de toluidina de los cultivos expuestos a PPB durante 24 h. Barra 20  $\mu$ m.

## 2. Evaluación de citotoxicidad combinada

El abordaje experimental se llevó a cabo manteniendo una dosis fija de uno de los compuestos, combinada con un rango de concentraciones del otro y viceversa. La coexposición se diseñó en base los datos de toxicidad individual de cada compuesto. Las dosis fijas elegidas de butilhidroxianisol y propilparabeno fueron 100 y 500  $\mu$ M respectivamente, siendo las concentraciones máximas estudiadas que no producían alteraciones morfológicas, y que presentaban efecto significativo para alguno de los parámetros analizados. Ninguna de ellas superaba un nivel de efecto del 50 % en los tratamientos individuales para el parámetro de contenido de proteína celular total. Este detalle tiene gran interés metodológico, ya que nos permite conservar una cantidad razonable de células para realizar los estudios. De este modo, se analizaron siete mezclas diferentes de BHA y PPB (tabla 10).

		PPB ( $\mu$ M)			
		50	200	400	500
BHA ( $\mu$ M)	1				
	10				
	100				
	300				

Tabla 10. Representación bidimensional de las combinaciones binarias ensayadas de BHA y PPB marcadas en rojo.

## Resultados

La viabilidad de los cultivos celulares expuestos a las diferentes combinaciones binarias durante 24 horas presentó tendencias similares entre los dos ensayos realizados (reducción del MTT y captura de rojo neutro). Además, ambos resultaron ser prácticamente idénticos a la cuantificación de la proteína celular total, como ya había ocurrido con los compuestos por separado (figura 13).

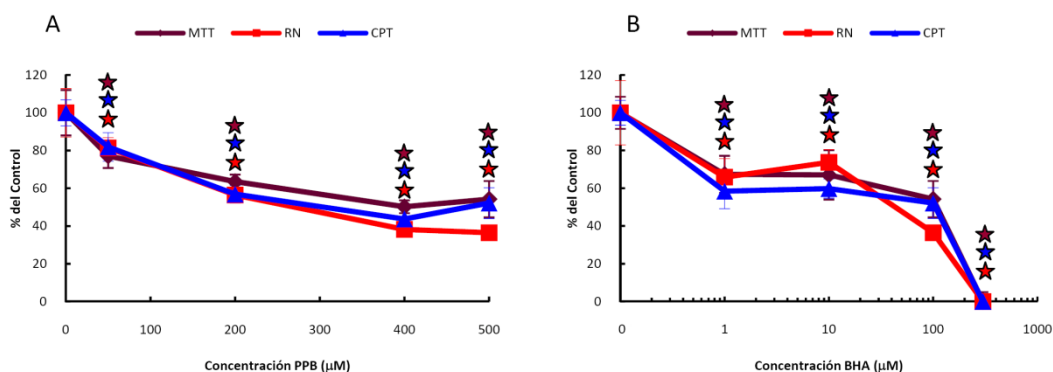


Figura 13. Ensayos de reducción de MTT, captura de rojo neutro y CPT tras 24 horas de exposición a mezclas binarias de BHA y PPB. (A) Combinaciones binarias compuestas por 100 µM de BHA y un rango de concentraciones de PPB (50-500 µM). (B) Combinaciones binarias compuestas por 500 µM de PPB y un rango de concentraciones de BHA (1-300 µM). Las estrellas indican las concentraciones que muestran efectos estadísticamente significativos con respecto al control (ANOVA y *post hoc* Bonferroni,  $p \leq 0.05$ ).

Las correlaciones entre los ensayos de viabilidad y CPT fueron estadísticamente significativas demostrando de nuevo la existencia de un claro efecto antiproliferativo (tabla 11).

CORRELACIONES BIVARIADAS PARCIALES							
BHA 100 µM + PPB (50-500 µM)				PPB 500 µM + BHA (1-300 µM)			
	CPT	MTT	RN		CPT	MTT	RN
CPT	-	0.70*	0.90*	CPT	-	0.74*	0.82*

Tabla 11. Análisis de correlación de los dos ensayos de viabilidad frente al CPT en cultivos expuestos a mezclas binarias de BHA y PPB durante 24 horas. Los asteriscos indican correlaciones estadísticamente significativas,  $p < 0.0001$ .


Cabe destacar que el recuento de índice mitótico resultó ser de nuevo el ensayo más sensible, poniendo de manifiesto que el modo de acción preferente de las combinaciones, igual que la de los compuestos individuales, es la inhibición de la proliferación del cultivo (tabla 12).

BHA 100 µM + PPB (50-500 µM)					
Control	50	200	400	500	
100.0 ± 24.8	68.6 ± 13.7*	51.7 ± 11.7*	7.1 ± 3.1*	2.3 ± 2.8*	
PPB 500 µM + BHA (1-300 µM)					
Control	1	10	100	300	
100.0 ± 18.5	17.0 ± 6.1*	17.0 ± 7.3*	2.3 ± 2.8*	0.0 ± 0.0*	

Tabla 12. Tasas de proliferación de los cultivos expuestos a diferentes combinaciones binarias de BHA y PPB durante 24 horas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control sin droga (ANOVA y *post hoc* Bonferroni,  $p \leq 0.05$ ).

Tomando en su conjunto todos los datos de citotoxicidad basal, se ordenaron las mezclas en función de la respuesta de los cuatro parámetros cuantitativos empleados (tabla 13). En base a esta tabla, existen tres grupos de mezclas de BHA-PPB: la menos tóxica 100-50 (verde), la más tóxica 300-500 (roja) y un conjunto de cinco combinaciones de toxicidad intermedia y con órdenes variables en función de cada parámetro (degradado verde-naranja).

	100-50	100-200	1-500	10-500	100-400	100-500	300-500
IM	68,6	51,7	17,0	17,0	7,1	2,3	0,0
RN	81,4	56,4	65,9	73,7	38,2	36,5	0,0
MTT	77,1	63,5	67,4	67,1	50,2	54,2	0,0
CPT	81,9	56,8	58,4	59,8	43,7	52,1	0,0

Tabla 13. Ordenación de las mezclas binarias en función de la toxicidad de la respuesta a las 24 horas según los cuatro parámetros cuantitativos empleados. El gradiente de color de color verde-rojo (  ) se utiliza para indicar la magnitud del efecto de menos a más tóxico.

Definiendo el efecto como la diferencia entre la viabilidad (o la proliferación) media del control (100 %) y la determinada para el grupo de tratamiento correspondiente, podemos observar que los resultados obtenidos para los dos ensayos de viabilidad celular mostraron que la mezcla menos tóxica producía un efecto en torno al 20 % (BHA 100  $\mu$ M + PPB 50  $\mu$ M), con valores idénticos y correlacionados con el CPT. También se observan descensos en la tasa de división en estas condiciones. En conjunto, estos datos demuestran que los compuestos en combinación producen un efecto antiproliferativo, sin alterar preferentemente la función mitocondrial ni la integridad del compartimento endosomal. Por otro lado, la mezcla más tóxica para todos los parámetros estudiados, BHA 300  $\mu$ M + PPB 500  $\mu$ M mostraba resultados de viabilidad y proliferación nulos, así como un gran número de células en la fracción flotante del cultivo.

El resto de mezclas evaluadas mostraron valores de proteína celular total y viabilidad respecto al control entre el 75 y el 35 %. Las combinaciones de 500  $\mu$ M de PPB con 1 y 10  $\mu$ M de BHA y las de BHA 100  $\mu$ M con 200, 400 y 500  $\mu$ M de PPB mostraron respuestas muy similares entre los tres ensayos, confirmando el efecto antiproliferativo detectado mediante análisis de correlación. Sin embargo, el índice mitótico se vio más intensamente afectado que el resto de ensayos, excepto para la mezcla BHA 100  $\mu$ M + PPB 200  $\mu$ M, donde el resultado era prácticamente equivalente al de las otras tres pruebas.

Una vez evaluada cuantitativamente la citotoxicidad basal de las siete mezclas, empleando los mismos parámetros que en el estudio de los efectos individuales, se procedió a analizar morfológicamente el estado de los cultivos mediante la evaluación microscópica con azul de toluidina. Como se observa en la figura 14, las células Vero del cultivo control (A) presentan morfología fibroblástica, destacando su citoplasma ancho y plano y un nucleolo formado generalmente por dos o tres marcas fuertemente picnóticas en el núcleo, destacando además la presencia de células en división.

Por su parte, la mezcla compuesta por BHA 100  $\mu$ M + PPB 500  $\mu$ M provocó vacuolización citosólica y pleiomorfismo en las células expuestas (B). En los cultivos expuestos a BHA 300  $\mu$ M + PPB 500  $\mu$ M, hay que reseñar que el gran efecto inducido por la mezcla es el descenso en el nivel de confluencia del cultivo, en gran medida

fruto de la pérdida de adhesión, observándose además degeneración hidrópica (C). Por separado, ni 500  $\mu\text{M}$  de propilparabeno (D) ni 100  $\mu\text{M}$  de BHA (E) mostraron cambios citológicos evidentes con la tinción de azul de toluidina. Sin embargo, 300  $\mu\text{M}$  de BHA provocó vacuolización citoplasmática (F), con una intensidad similar a la observada en los cultivos expuestos a la combinación binaria BHA 100  $\mu\text{M}$  + PPB 500  $\mu\text{M}$  y menos grave que la descrita para BHA 300  $\mu\text{M}$  + PPB 500  $\mu\text{M}$ . Por último hay que indicar que el resto de mezclas no mostraron alteraciones morfológicas.

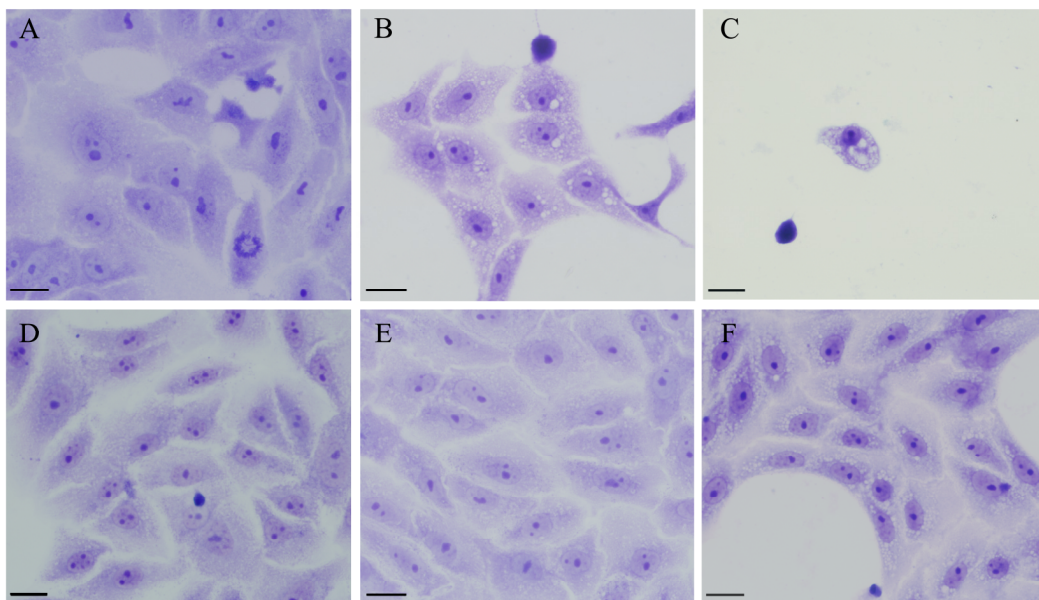


Figura 14. Estudio de morfología general mediante microscopía de campo claro y tinción con azul de toluidina de los cultivos expuestos a butilhidroxianisol y/o propilparabeno durante 24 h. Barra 20  $\mu\text{m}$ . (A) Cultivo control, (B) células Vero tras la exposición a *Mix 100* y (C) *Mix 300*. (D) Representa un cultivo de células Vero tratadas con 500  $\mu\text{M}$  de PPB, (E) 100  $\mu\text{M}$  de BHA y (F) 300  $\mu\text{M}$  de BHA.

### 3. Determinación del mecanismo de acción tóxica

Con el fin de determinar el mecanismo de acción tóxica mediante el que se induce la inhibición de la proliferación en las mezclas binarias, los estudios se complementaron con diversas técnicas de análisis más específicas. En esta segunda fase del estudio se analizaron las dos combinaciones binarias definidas como las más tóxicas de entre las siete evaluadas, que corresponden a BHA 300 – PPB 500 (*Mix 300*) y BHA 100 – PPB 500 (*Mix 100*).

#### 3.1. Estudio del mecanismo de acción de *Mix 300*

Teniendo en cuenta que prácticamente todo el cultivo expuesto a la mezcla se había desprendido del sustrato, se realizó un recuento en un hemocitómetro para precisar el porcentaje de células que permanecían adheridas. Además, se procesaron siguiendo el protocolo para el ensayo de exclusión de azul tripán, con el fin de determinar si la membrana plasmática era funcional o si por el contrario había perdido su integridad.

Estos resultados indicaron que un  $86.6 \pm 9.6 \%$  de las células expuestas a la combinación aparecían en la fracción flotante. A pesar de ello, ninguna célula expuesta a la mezcla durante 24 h era permeable a azul tripán. Los tratamientos individuales también produjeron niveles significativos de células que perdían su

adhesión al sustrato, aunque no tan elevados (ANOVA, *post hoc* Bonferroni,  $p \leq 0.05$ ). Los tratamientos con 300  $\mu\text{M}$  de BHA produjeron un  $19.5 \pm 4.8$  % de células flotantes y con 500  $\mu\text{M}$  de PPB del  $6.3 \pm 0.0$  %. En las mismas condiciones, los cultivos control mostraron valores de pérdida de adhesión nulos ( $1.1 \pm 3.3$  %) y no aparecían células con la membrana plasmática alterada. Hay que destacar que tampoco en los tratamientos individuales se obtuvieron valores estadísticamente significativos de células positivas a azul tripán.

Para determinar el estado en que se encontraban las células en suspensión, se realizó un análisis de las morfologías nucleares mediante microscopía óptica de fluorescencia después de la tinción con Hoechst 33258. Como se observa en la figura 15 el tratamiento *Mix 300* mostraba núcleos con distintas morfologías:

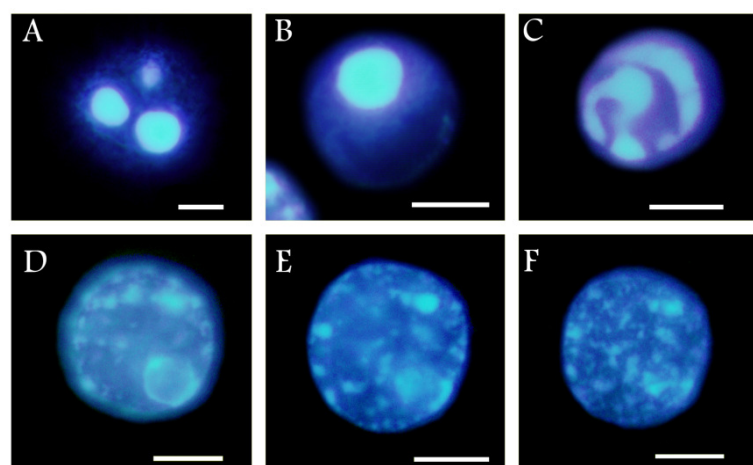


Figura 15. Distintas morfologías nucleares presentes en la fracción flotante del cultivo celular tras la exposición durante 24 horas a *Mix 300*. (A) Núcleo típicamente apoptótico que presenta cariorrexis. (B) Núcleo de una célula muerta con un único bloque de cromatina muy condensado y picnótico. (C) Cromatina heterogéneamente condensada con “aspecto cremoso”. (D-F) Núcleo interfásico analizado en distintos planos focales que muestra regiones punteadas altamente positivas tras el marcaje con Hoechst 33258. Barra 5  $\mu\text{m}$ .

El recuento de las morfologías nucleares mostró que un  $21.2 \pm 3.2$  % eran células vivas, aunque no se observaban figuras mitóticas, lo que confirmó que el cultivo estaba sometido a una fuerte parada de la proliferación. En cambio, en la fracción flotante de los tratamientos individuales sólo se observaron núcleos típicamente apoptóticos, que resultaban ser el  $17.5 \pm 3.9$  % del total del cultivo para 300  $\mu\text{M}$  de BHA y el  $2.3 \pm 0.7$  % para 500  $\mu\text{M}$  de PPB.

En esta etapa del estudio se profundizó en el mecanismo de bloqueo de ciclo celular en interfase, para lo que se procedió a un análisis mediante citometría de flujo. En la figura 16, se observa el histograma de frecuencias de carga de ADN de un cultivo control de células Vero tras 24 h (A). En los cultivos expuestos a los compuestos de manera individual, lo que más llama la atención es el fuerte bloqueo en G0-G1 y los descensos en la fase S y G2-M (B y C). Sin embargo, los tratamientos *Mix 300* muestran un evidente cambio de perfil (D). Se produce la reducción a la mitad del porcentaje de células en fase G0-G1, la casi duplicación de la proporción de células en fase S y no hay variaciones significativas en el periodo G2-M. Las diferencias más llamativas se observaron en la región donde se distribuyen las células con mayor contenido en ADN. El cultivo tratado incrementa su nivel medio de células poliploides hasta casi cinco veces con respecto al control.



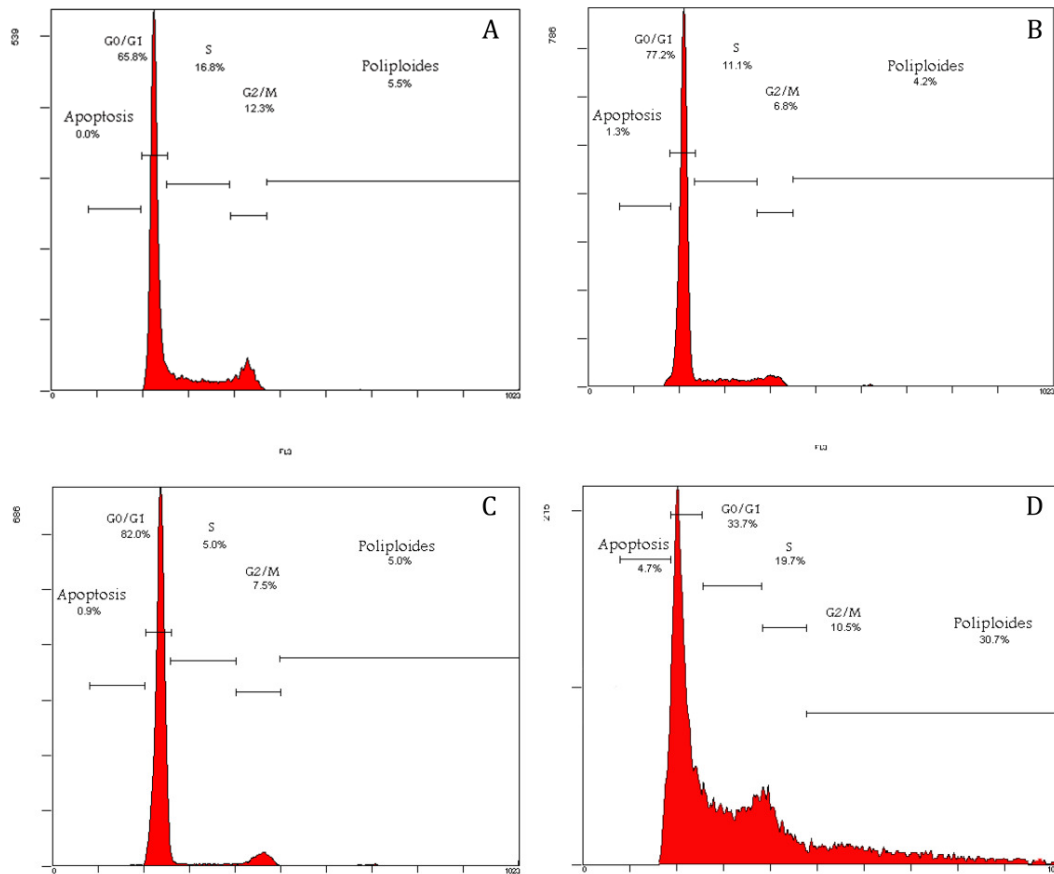


Figura 16. Histogramas representativos de la frecuencia de células en las distintas fases del ciclo celular analizadas tras los tratamientos con BHA y/o PPB durante 24 horas (n=6 por tratamiento). (A) Cultivo control, (B) 300  $\mu$ M de BHA, (C) 500  $\mu$ M de PPB y (D) *Mix 300*.

A la luz de estos resultados, los datos se analizaron empleando un programa informático para modelizar ciclos celulares diploide-tetraploide (*ModFit LT<sup>TM</sup> 3.0*), que estima la fase del ciclo celular tetraploide en la que se encuentran las células. Los resultados indicaron que las células con carga igual o superior a 4c se encontraban fundamentalmente en el periodo S y su ciclo diploide carecía de G2-M (figura 17).

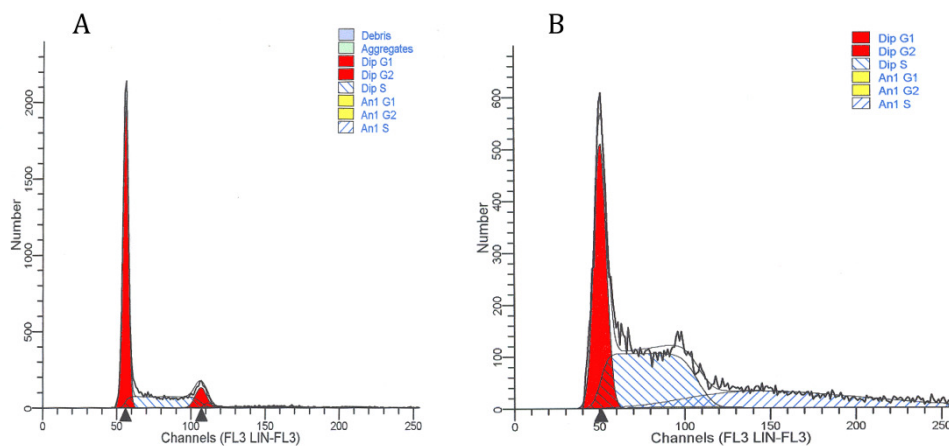


Figura 17. Modelización del ciclo diploide-tetraploide de los histogramas representativos del ciclo celular del control (A) y de *Mix 300* (B) empleando *ModFit LT<sup>TM</sup> 3.0*. *Dip S*: fase S de la población diploide, *An1 S*: fase S de la aneuploide.

Como se observa en la figura 18, exposiciones más largas en el tiempo (48 h) mostraron que el histograma del control no variaba (A) mientras que los de los compuestos individuales mostraban una mayor cantidad de células en sub-G1 (B y C). Además, el cultivo expuesto 48 h a la mezcla mostró un incremento de células muertas y restos celulares, cambiando drásticamente el perfil observado no sólo en el control, sino con el mismo tratamiento 24 horas antes (D).

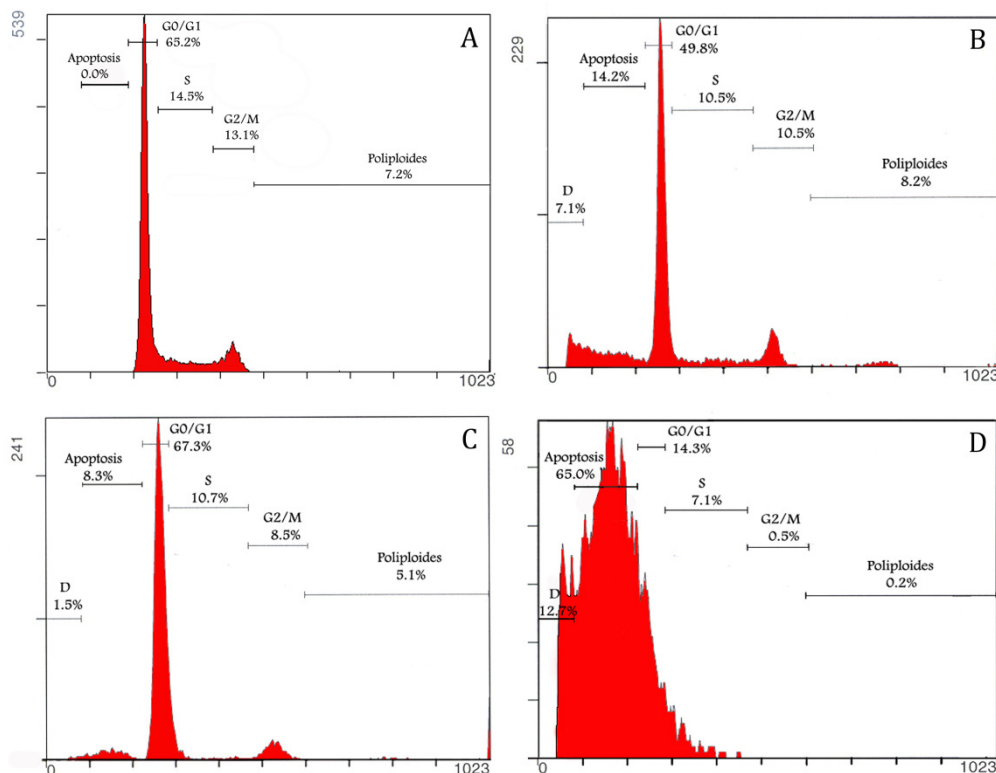


Figura 18. Histogramas representativos de frecuencias de células en cada fase del ciclo celular analizando la carga de ADN por citometría de flujo tras 48 horas de exposición continua a BHA y/o PPB (n=6 por tratamiento). (A) Cultivo control, (B) 300  $\mu$ M de BHA, (C) 500  $\mu$ M de PPB y (D) Mix 300.

Con el fin de analizar la secuencia cronológica de los efectos que conducen a la muerte celular del cultivo y con ello, profundizar en el mecanismo de acción tóxica, se procedió a analizar las alteraciones observadas en estos mismos tratamientos a menores tiempos de exposición. Se evaluó la viabilidad celular y el contenido de proteína total de *Mix 300* tras 4 horas de exposición (figura 19). Los ensayos de cuantificación de la proteína celular total, reducción del MTT y de captura de rojo neutro determinaron que la diana de acción primaria de esta combinación binaria eran las membranas celulares, ya que el test del rojo neutro era el más sensible, mostrando valores de viabilidad inferiores al 40 % con respecto al control, cuando el resto de ensayos mostraban resultados alrededor del 75 %. Con estos datos, concluimos que *Mix 300* tras 4 horas de exposición induce una alteración específica de las membranas del compartimento endosomal, ya que la membrana plasmática estaba íntegra y las células eran impermeables al azul tripán. Los tratamientos individuales mostraron efectos significativos para 300  $\mu$ M de BHA en la captura de rojo neutro y el contenido de proteína total. Sin embargo, sólo la integridad del compartimento endosomal se vio afectada significativamente tras la exposición durante 4 horas a 500  $\mu$ M de PPB.

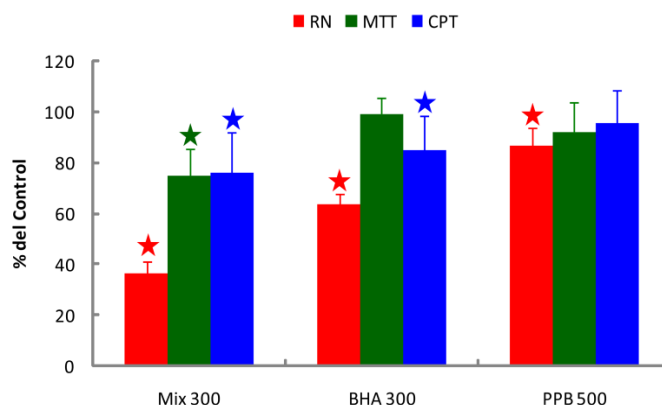


Figura 19. Análisis de citotoxicidad basal tras 4 horas de exposición a *Mix 300* y a sus componentes individuales empleando dos ensayos de viabilidad y el CPT. Las estrellas de colores muestran diferencias significativas con respecto al control (t-Student,  $p \leq 0.05$ ).

Los resultados cuantitativos se complementaron con pruebas específicas para evaluar la integridad del compartimento endosomal y del retículo mitocondrial en las mismas condiciones experimentales (figura 20). Las células Vero presentan un compartimento endosomal bien desarrollado y de contenido ácido (A). Los tratamientos individuales con butilhidroxianisol indujeron alcalinización, tumefacción y pérdida del patrón de distribución típico de los lisosomas (B). Los tratamientos con PPB sólo produjeron una leve alcalinización del compartimento endosomal (C). Sin embargo, las células expuestas a la mezcla binaria (D) no eran capaces de acumular naranja de acridina en sus lisosomas y presentaban daños graves como la intensa vacuolización citosólica y la alteración de la morfología general.

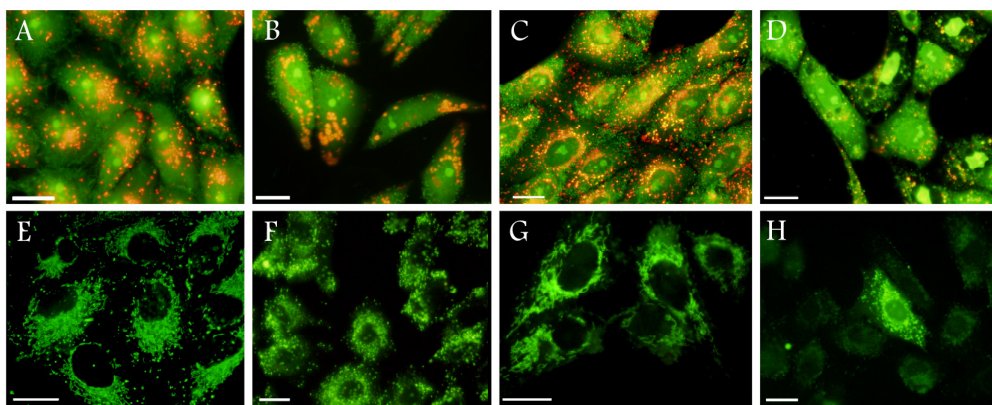


Figura 20. Marcaje supravital con naranja de acridina (A-D) y con rodamina 123 (E-H) tras 4 horas de exposición. (A y E) corresponden a cultivos control no expuestos. (B y F) muestran células Vero tratadas con 300  $\mu\text{M}$  de butilhidroxianisol. Las imágenes (C y G) muestran cultivos incubados con 500  $\mu\text{M}$  de propilparabeno y en (D y H) se pueden observar las alteraciones inducidas por *Mix 300*. Barra 20  $\mu\text{m}$ .

Por otra parte, las células Vero control marcadas con el colorante supravital rodamina 123 (E) mostraron mitocondrias con una distribución reticular característica alrededor del núcleo. El tratamiento individual con butilhidroxianisol mostró fragmentación del retículo mitocondrial (F). Por el contrario, no se observaron daños tras la exposición a propilparabeno (G). Sin embargo, se puede observar que la exposición a *Mix 300* produjo una severa fragmentación del retículo mitocondrial y una aparente pérdida de su potencial de membrana (H).



Finalmente, los resultados se completaron mediante recuentos de índice mitótico. Como se observa en la tabla 14 ningún tratamiento individual, ni la combinación de ellos produjo variaciones en la tasa de división del cultivo tras 4 horas de exposición. Sin embargo, el recuento del índice de fases determinó que los valores del índice mitótico de la mezcla binaria estaban fundamentalmente sustentados por un incremento significativo de la frecuencia de metafases. Esto explicaría en parte los resultados obtenidos por el ensayo de Bradford. Sin embargo, no hay que olvidar que la cuantificación del contenido de proteína total puede verse influenciado por la pérdida de adhesión del cultivo y que, dado que las células mostraban síntomas de grave afectación, no serían descartables alteraciones en el citoesqueleto de actina.

Tasa de división 4 h				
	Control	BHA 300 $\mu$ M	PPB 500 $\mu$ M	Mix 300
<b>Índice mitótico</b>	100.0 $\pm$ 18.6	92.3 $\pm$ 22.7	99.6 $\pm$ 23.1	95.7 $\pm$ 15.6
<b>Frecuencia de metafases</b>	47.9 $\pm$ 10.3	41.2 $\pm$ 4.7	47.0 $\pm$ 13.9	61.3 $\pm$ 13.6*

Tabla 14. Índice mitótico como porcentaje respecto al control y frecuencia de metafases en células Vero tras 4 horas de exposición a *Mix 300* y a sus componentes individuales. Los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas con el control (t-Student,  $p \leq 0.05$ ).

En este punto, se procedió a la cuantificación del porcentaje de células que se encontraban en la fracción flotante y por otro lado el de las que estaban adheridas al sustrato, tras la exposición a diferentes tiempos con *Mix 300*. Con todos estos datos se determinó que las células expuestas a la combinación binaria mostraron un incremento significativo de la pérdida de adhesión después de 4 horas. A las 9 h, los cultivos tratados con *Mix 300* presentaban algo más del 40 % del cultivo en la fracción flotante, cuando los tratamientos individuales rondaban el 5 %. La combinación binaria provocó que el  $86.6 \pm 9.6$  % de las células se encontraran en la fracción flotante tras 24 h de tratamiento, viéndose afectada la adhesión en la totalidad del cultivo a las 48 h (figura 21).

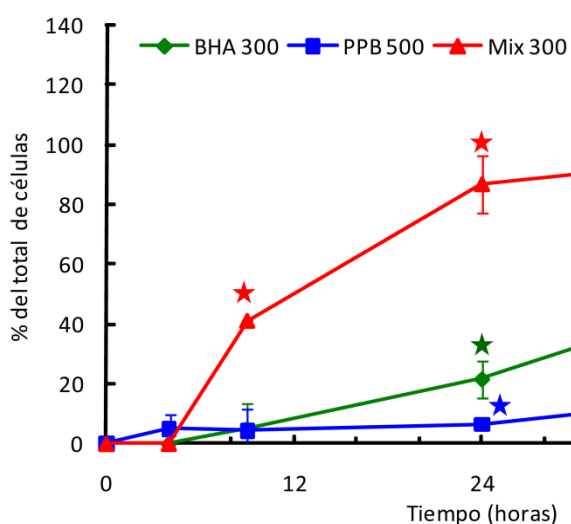


Figura 21. Estudio de adhesión celular. Porcentaje de células en la fracción flotante de los cultivos expuestos a *Mix 300* y a sus componentes individuales a lo largo del tiempo. Las estrellas de colores señalan los tiempos de exposición que muestran variaciones estadísticamente significativas con respecto al control (ANOVA y *post hoc* Bonferroni  $p \leq 0.05$ ).

Estos estudios cuantitativos fueron complementados con detecciones específicas del citoesqueleto, que nos permitieron analizar las posibles alteraciones en los microfilamentos de actina, implicados en la adhesión celular. En la figura 22, se puede observar que los tratamientos individuales con BHA y PPB tras 4 y 9 horas no alteraban el citoesqueleto de actina, que presenta un aspecto similar en las células control. Sin embargo, los cambios son muy evidentes en *Mix 300* desde las 4 horas de exposición, donde se observan graves alteraciones morfológicas, destacando el aspecto dendrítico de algunas células, la pérdida de adhesión y la desorganización del citoesqueleto de actina.

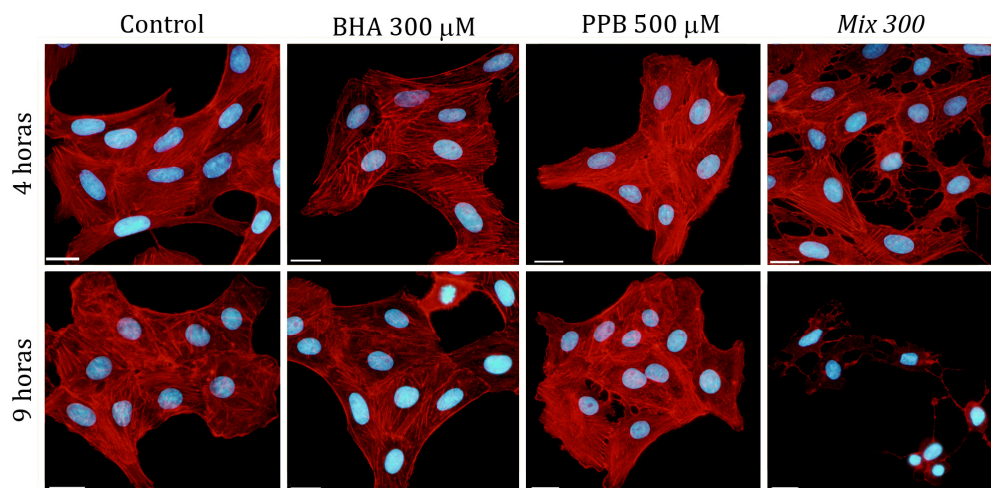


Figura 22. Análisis del citoesqueleto de actina mediante detección específica con faloidina conjugada con TRITC y contratinción con Hoechst 33258. Imágenes representativas del cultivo de células Vero expuestas a 300  $\mu\text{M}$  de BHA y/o 500  $\mu\text{M}$  de PPB durante 4 y 9 horas. Barra 20  $\mu\text{m}$ .

En los tratamientos de 9 horas, se observa el evidente descenso de la confluencia del cultivo, que coincide con el significativo incremento que presenta la gráfica de pérdida de adhesión en este tiempo de exposición. Además hay que destacar la alteración de la típica morfología fibroblástica de las células Vero y la absoluta desorganización de las fibras de estrés, que explicaría el problema de adhesión.

El patrón de microtúbulos no mostraba alteraciones destacables en las células interfásicas tras 4 h, salvo por las derivadas del cambio morfológico general inducido por los tratamientos con la mezcla binaria (figura 23). Sin embargo y como ya hemos descrito anteriormente, se observó un incremento en el porcentaje de células en metafase para los cultivos expuestos a *Mix 300*.

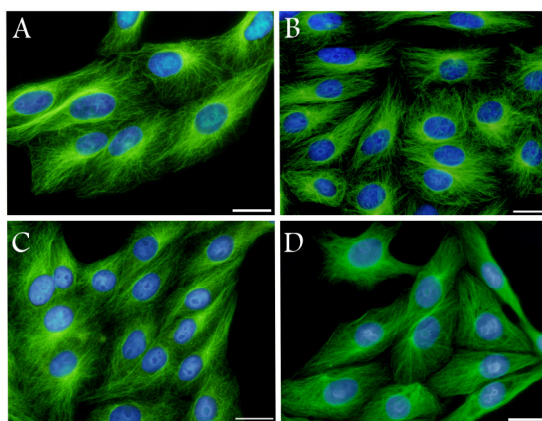


Figura 23. Inmunodetección específica del citoesqueleto de tubulina en interfase y contratinción con Hoechst 33258 tras 4 horas de tratamiento con BHA y/o PPB. Imágenes representativas de un cultivo control (A), expuesto a 300  $\mu\text{M}$  de BHA (B), 500  $\mu\text{M}$  de PPB (C) y *Mix 300* (D). Barra 20  $\mu\text{m}$ .

El estudio detallado de los husos mitóticos, mediante doble inmunodetección contra  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tubulina (figura 24), demostró que tras el tratamiento, se podían encontrar dos tipos de metafases. En las primeras, los cromosomas no se disponían en la placa metafásica (A) y no se formaban husos mitóticos bipolares (B), ya que las dos parejas de centrosomas se mantenían juntas (C-D). Asimismo, se observaban metafases clásicas, con cromosomas en la placa ecuatorial (E) y husos con dos polos correctamente separados (F-G) similares a las observadas en el control.

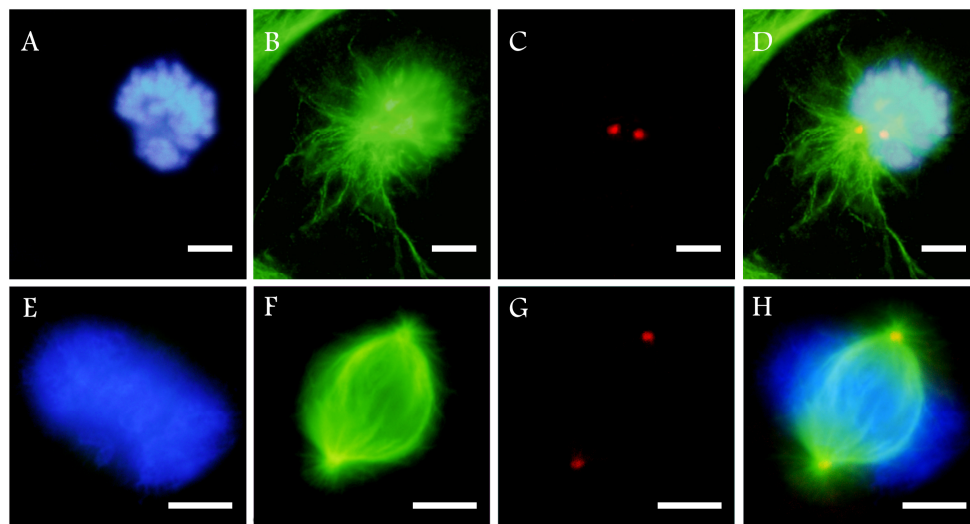


Figura 24. Análisis de las metafases de las células Vero tras 4 horas de tratamiento con *Mix 300*. Metafases aberrantes (A-D) y metafase control (E-H). Marcaje específico de cromatina con Hoechst 33258 (A y E). Inmunodetección de los microtúbulos del huso mitótico con anti- $\alpha$ -tubulina (B y F). Inmunodetección de los centrosomas con anti- $\gamma$ -tubulina (C y G). Imágenes superpuestas de los tres canales (D y H). Barra 5  $\mu$ m.

En la figura 25, se muestran cromosomas de células en prometafase con husos anómalos (A-C) y cromosomas no congregados y mal distribuidos, debido a la ausencia de microtúbulos cinetocóricos que los estabilizaran en la placa ecuatorial. Además, estas células presentaban cromosomas de menor tamaño que los observados en las prometafases de husos normales (D-F). La frecuencia de estas prometafases aberrantes a las 4 horas fue del  $45.0 \pm 17.3$  %, alcanzando el  $86.9 \pm 9.4$  % a las 9 horas. Es importante señalar que dichas alteraciones nunca fueron observadas en el control, ni en los tratamientos individuales (ANOVA y *post hoc* de Bonferroni,  $p \leq 0.05$ ).

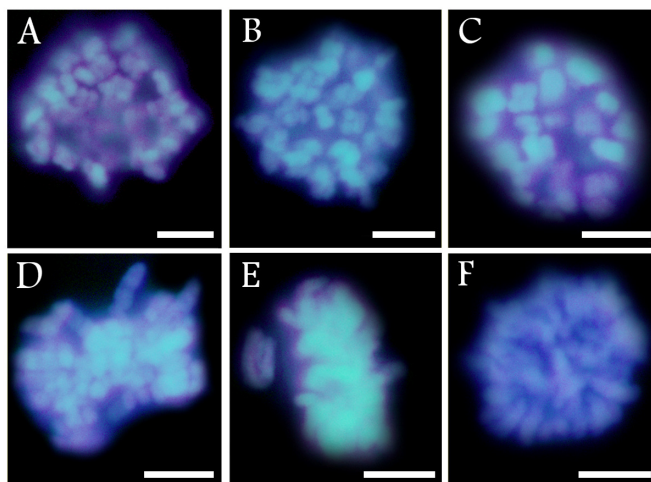


Figura 25. Estudio de la morfología de los cromosomas en metafase mediante tinción específica de ADN con Hoechst 33258. Núcleos de células en metafase que han estado expuestas durante 4 horas a *Mix 300* (A-C). Metafases de un cultivo control (D-F). Barra 5  $\mu$ m.

Nuestro siguiente paso, consistió en estudiar los cromosomas metafásicos de células tras los distintos tratamientos durante 4 horas. Tras esta exposición, incubamos 4 horas con Colcemida® para inducir un bloqueo en metafase. En la figura 26, se observan los cromosomas de una célula control (A) y de las expuestas a BHA (B) y a PPB (C), sin cambios evidentes. Las células expuestas a *Mix 300* (D) presentaban cromosomas de menor tamaño y diferente aspecto. Además, se detectaban puentes de cromatina entre los pequeños cromosomas, algo que no se observó en las metafases control, ni en las que de los cultivos tratados con los compuestos por separado.

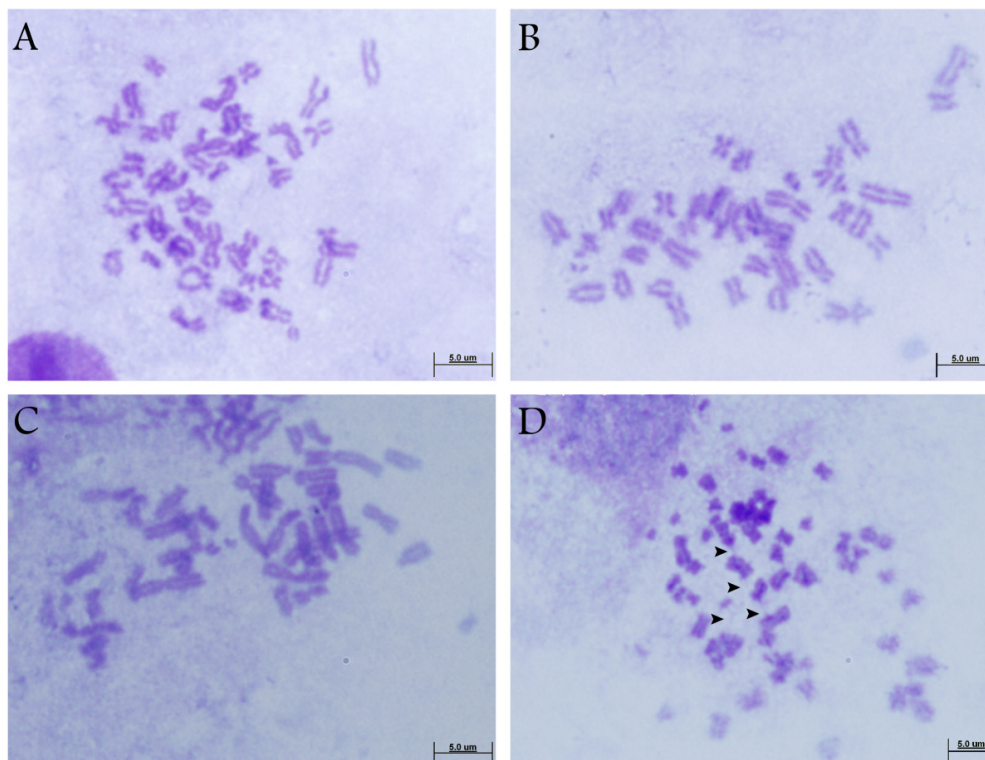


Figura 26. Análisis de la integridad cromosómica tras la exposición durante 4 horas a la combinación binaria *Mix 300* y a sus componentes individuales. Cromosomas metafásicos de una célula Vero control tras el bloqueo inducido por Colcemida® (A). Tratamientos con 300 µM de BHA (B) y 500 µM de PPB (C). Célula expuesta a la mezcla (D), las cabezas de flecha señalan puentes cromatínicos. Barra 5 µm.

En este momento del estudio, planteamos la hipótesis de que quizás las células expuestas a la mezcla binaria BHA 300 µM + PPB 500 µM pudieran estar sometidas a un estrés que les produjera condensación prematura de la cromatina (CPC), haciéndolas entrar en mitosis sin que la síntesis de ADN hubiera concluido. De manera general, los procesos de CPC están asociados con daño al ADN, por lo que nuestros siguientes análisis se encaminaron a determinar si las células expuestas a *Mix 300* sufrieron algún daño genotóxico. Para ello, llevamos a cabo una detección inmunocitoquímica contra 8-OHdG, obteniéndose resultados positivos para el cultivo tratado con la mezcla binaria, aunque también en las células expuestas a BHA y PPB por separado (figura 27).



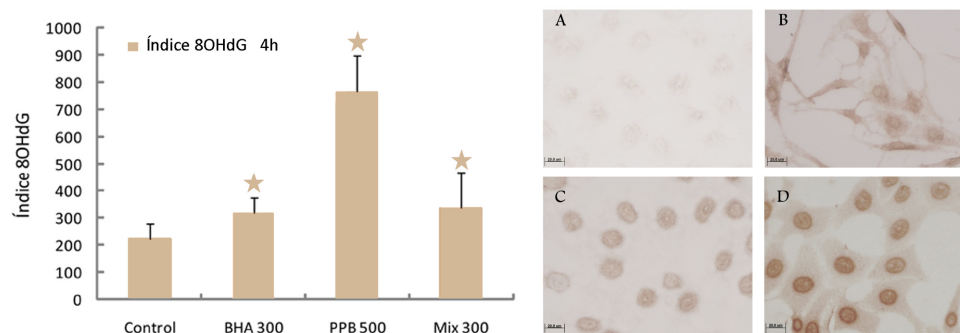


Figura 27. Detección del daño oxidativo al ADN mediante marcaje inmunocitoquímico contra 8-OHdG. La gráfica representa el índice 8-OHdG calculado para los diferentes tratamientos con BHA y/o PPB durante 4 horas. Las estrellas indican diferencias estadísticamente significativas (t-Student,  $p \leq 0.05$ ). Las imágenes de microscopía de campo claro muestran campos representativos de los cultivos control (A), *Mix 300* (B), 300  $\mu\text{M}$  de BHA (C) y 500  $\mu\text{M}$  de PPB (D). Barra 20  $\mu\text{m}$ .

La oxidación de bases del ADN suele deberse a la presencia intracelular de niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ERO) que cuantificamos mediante DCFH-DA. Como se observa en la figura 28, tras 4 horas de exposición a *Mix 300* se producía un incremento significativo en los niveles de estrés oxidativo, que se detectaba también en los cultivos tratados con BHA 300  $\mu\text{M}$  y con PPB 500  $\mu\text{M}$ , aunque con menor intensidad. La generación de radicales libres fue dependiente del tiempo de exposición, revelando tras 24 h un aumento respecto de 4 horas en todos los tratamientos.

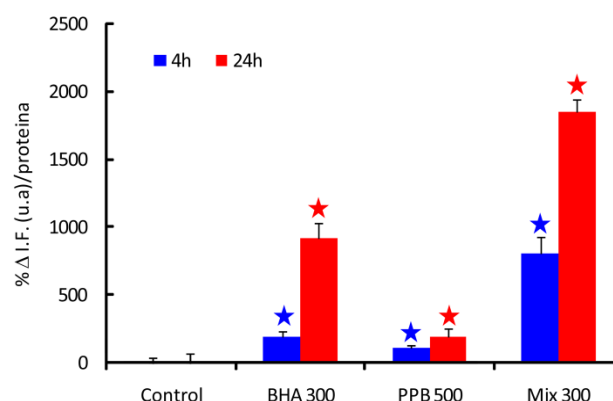


Figura 28. Cuantificación de estrés oxidativo mediante detección de diclorofluoresceína tras 4 y 24 horas de tratamiento con BHA y/o PPB. Las estrellas indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (t-Student,  $p \leq 0.05$ ).

El estrés oxidativo puede ser responsable de la oxidación de bases, pero es poco frecuente que se encuentre directamente asociado a los procesos de condensación prematura de la cromatina. Sin embargo, las roturas de doble cadena de ADN suelen aparecer asociadas a CPC, por lo que llevamos a cabo una inmunodetección de  $\gamma\text{-H2AX}$  para comprobar este daño genotóxico en nuestras condiciones experimentales. Nuestros resultados mostraron que tras 4 horas de exposición a *Mix 300*, se triplicó con respecto al control el porcentaje de células del cultivo que presentaban roturas de doble cadena (DSB). En cuanto a los tratamientos individuales, se observaron incrementos en las frecuencias de células con roturas de doble cadena, aunque no fueron estadísticamente significativos (figura 29).

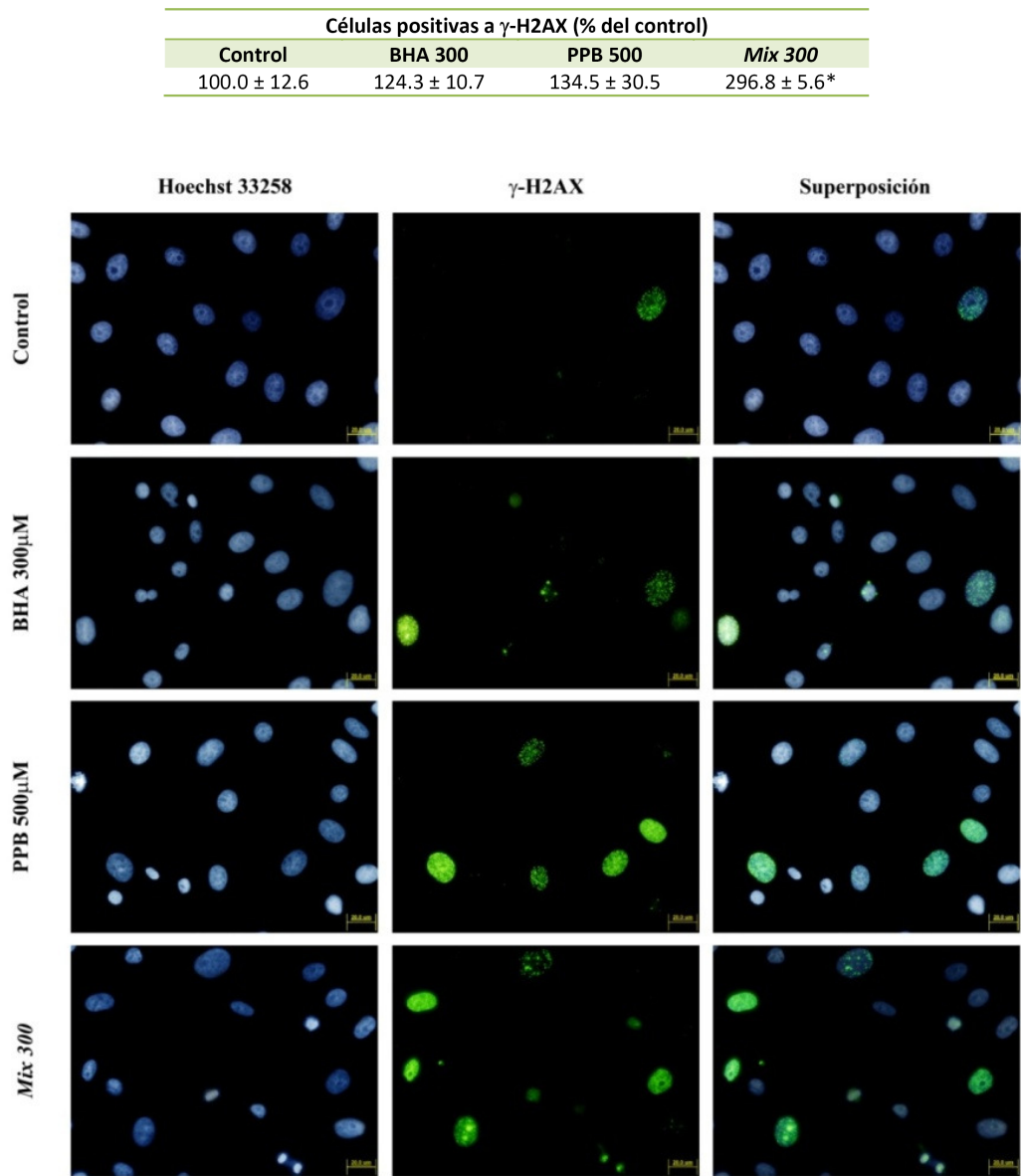


Figura 29. Detección específica de roturas de doble cadena de ADN mediante inmunofluorescencia contra  $\gamma$ -H2AX. La tabla muestra valores medios y la desviación estándar de la frecuencia de células positivas a DSB tras 4 horas de tratamiento, como porcentaje respecto al control. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con el control (t-Student,  $p \leq 0.05$ ). En las imágenes se muestran campos representativos de los diferentes cultivos tratados. Barra 20  $\mu$ m.

3.2. Estudio del mecanismo de acción de *Mix 100*

A diferencia de lo que ocurría en los tratamientos con *Mix 300*, los cultivos incubados con *Mix 100* presentaron un  $18.0 \pm 8.2$  % de células en la fracción flotante, todas ellas con morfología nuclear apoptótica. Del mismo modo, 500  $\mu$ M de PPB provocó la muerte celular y la pérdida de adhesión al sustrato en un  $6.3 \pm 0.0$  % de las células. Sin embargo, 100  $\mu$ M de BHA no tuvo efecto sobre la adhesión ni indujo muerte celular, mostrando valores similares a los de los cultivos control (t-Student,  $p \leq 0.05$ ).

Los análisis realizados sobre la integridad del citoesqueleto (figura 30) revelaron que el patrón de microtúbulos no se vio alterado ni en interfase, ni en división. Sin embargo, la detección específica de microfilamentos de actina mostró una clara desorganización del patrón general con un descenso del número de fibras de estrés y la aparición de células con aspecto dendrítico.

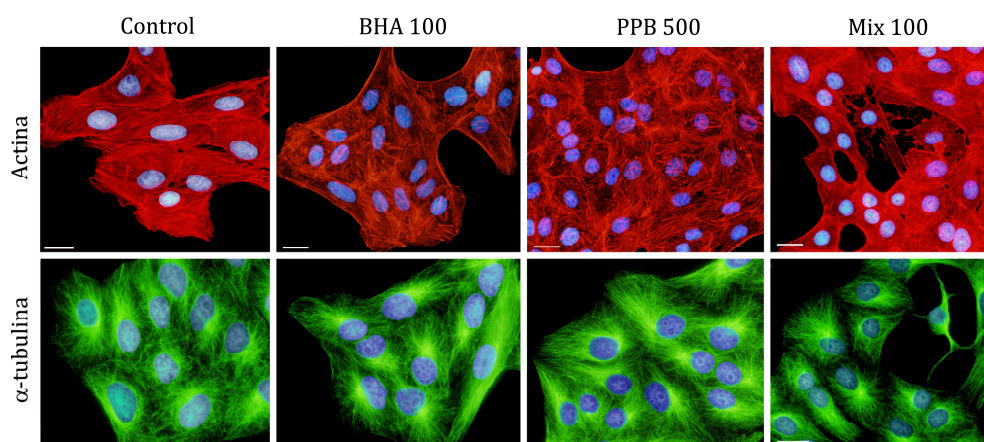


Figura 30. Análisis del citoesqueleto celular mediante detecciones específicas tras 24 horas de exposición a BHA y/o PPB. Imágenes representativas de los microfilamentos de actina (rojo), microtúbulos interfásicos (verde) y ambos marcajes contrateñidos con Hoechst 33258 (azul). Barra 20  $\mu$ m.

Además de las alteraciones sobre el citoesqueleto, las membranas celulares en general y el compartimento endosomal en particular vieron comprometida su estabilidad como se había visto en los ensayos previos de citotoxicidad, ya que el ensayo de captura de rojo neutro fue el segundo biomarcador más sensible para *Mix 100*. A pesar de esto, el ensayo de exclusión del azul tripán, que evalúa la integridad de la membrana plasmática, mostró resultados negativos (t-Student,  $p \leq 0.05$ ). Estos estudios se complementaron con pruebas de la morfología subcelular mediante el marcaje supravital con naranja de acridina (figura 31). Las células Vero control mostraron un patrón de distribución de lisosomas marcados en rojo-naranja intenso (A), que se vio levemente alcalinizado en tratamientos con BHA (B) y con PPB (C). Las células expuestas a *Mix 100* también mostraron ligera alcalinización del compartimento endosomal y una desorganización del patrón clásico de lisosomas (D).

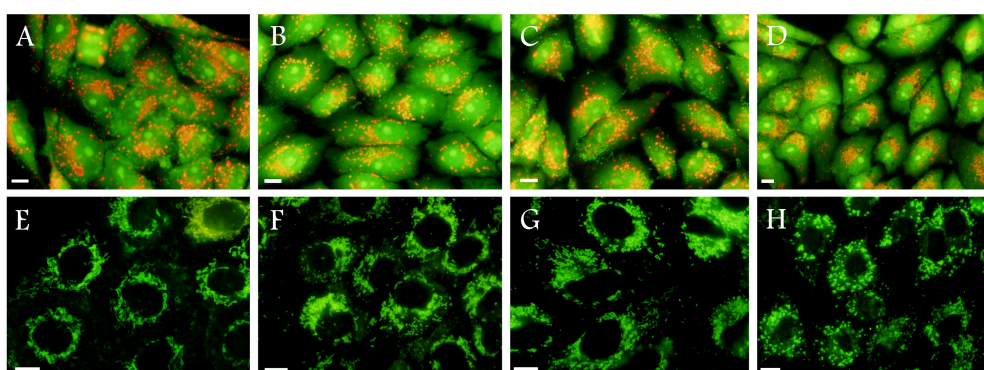


Figura 31. Marcaje supravital con naranja de acridina (A-D) y con rodamina 123 (E-H) tras 24 horas de tratamiento. (A y E) corresponden a cultivos control no expuestos. (B y F) muestran células Vero tratadas con 100  $\mu$ M de butilhidroxianisol. Las imágenes (C y G) muestran cultivos incubados con 500  $\mu$ M de propilparabeno y en (D y H) se pueden observar las alteraciones inducidas por *Mix 100*. Barra 20  $\mu$ m.

En el análisis de la morfología subcelular que complementaba los estudios de citotoxicidad basal, empleamos rodamina 123 para determinar el estado de las mitocondrias, que se veía afectado según el ensayo de reducción del MTT. Las células control (E) presentaban un patrón filamentososo de mitocondrias alrededor del núcleo y los tratamientos individuales provocaron ligeras fragmentaciones del retículo mitocondrial (F-G). Del mismo modo, *Mix 100* desencadenó una evidente fragmentación de este orgánulo (H).

Por otro lado y teniendo en cuenta que la tasa de división del cultivo fue el parámetro más sensible, el estudio prosiguió con un análisis pormenorizado del ciclo celular. El índice mitótico de los cultivos expuestos a *Mix 100* fue prácticamente nulo ( $2.3 \pm 2.8 \%$ ) tras 24 horas, lo que puede explicar la reducción del CPT, junto con la pérdida de adhesión del cultivo. Con el fin de precisar con exactitud la etapa de la interfase en la que se produce el bloqueo, realizamos estudios de contenido de ADN mediante citometría de flujo (figura 32). El histograma de frecuencias para un cultivo control de células Vero se muestra en (A). Los tratamientos con 100  $\mu\text{M}$  de BHA (B) provocaron sólo descensos significativos en la fase G2-M (t-Student,  $p \leq 0.05$ ). Sin embargo, en el caso del cultivo expuesto a 500  $\mu\text{M}$  de propilparabeno (C) y de la combinación binaria (D) se observó un bloqueo del ciclo en G0-G1, con descensos en S y G2-M. Además, *Mix 100* mostró incrementos significativos con respecto al control en el porcentaje de células con cargas superiores a 4c, que no se observaban en los tratamientos individuales (t-Student,  $p \leq 0.05$ ).

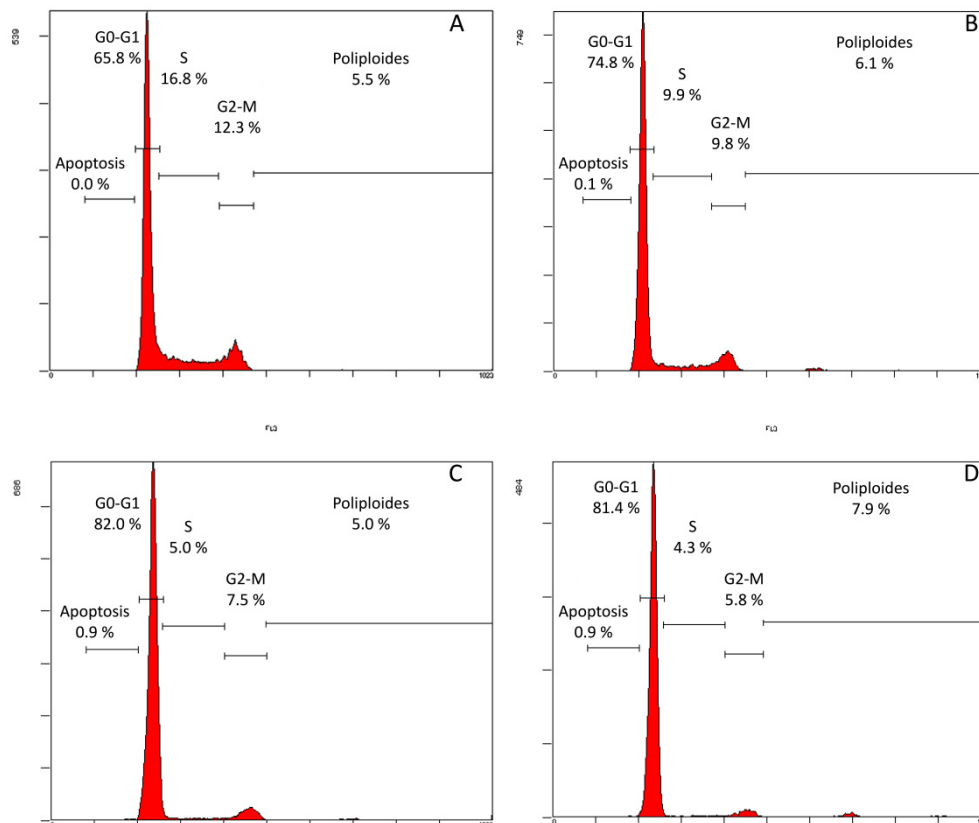


Figura 32. Histogramas representativos de la frecuencia de células en cada fase del ciclo celular analizando la carga de ADN por citometría de flujo tras 24 horas de exposición a la combinación binaria *Mix 100* y a sus componentes individuales (n=6 por tratamiento). (A) Cultivo control, (B) 100  $\mu\text{M}$  de BHA, (C) 500  $\mu\text{M}$  de PPB y (D) *Mix 100*.



Teniendo en cuenta que los efectos que estábamos detectando en *Mix 100* eran muy similares a los previamente observados en *Mix 300* y que la composición sólo difiere en la concentración de un compuesto, decidimos estudiar los niveles de especies reactivas de oxígeno y el posible daño al ADN por oxidación de bases. Este tipo de abordaje está recomendado por multitud de organismos reguladores como la Agencia de Protección Ambiental y la Sociedad de Toxicología estadounidenses y consiste en estimar los efectos esperables en función de la homología de las mezclas, lo que se conoce como aproximación por analogía o “*read across*”.

Los resultados mostraron incrementos significativos de los niveles de especies reactivas de oxígeno, en los cultivos tratados con la combinación binaria y con el propilparabeno de manera individual, a las 4 y 24 horas de exposición. Sin embargo, BHA 100  $\mu\text{M}$  mostró una ligera capacidad antioxidante en los cultivos expuestos induciendo descensos en los niveles de ERO tras 24 h (figura 33).

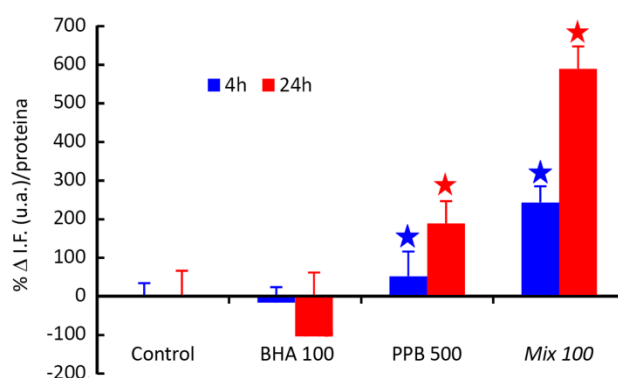


Figura 33. Cuantificación de estrés oxidativo por fluorimetría, mediante el ensayo de la diclorofluoresceína tras 24 horas de exposición a BHA y/o PPB. Las estrellas indican diferencias estadísticamente significativas (t-Student,  $p \leq 0.05$ ).

Ante esta situación realizamos un estudio de detección inmunoespecífica contra 8-OHdG tras 24 h de exposición. Las imágenes mostraban una oxidación de bases generalizada en todos los tratamientos evaluados (figura 34), cuando en el control era inapreciable (A).

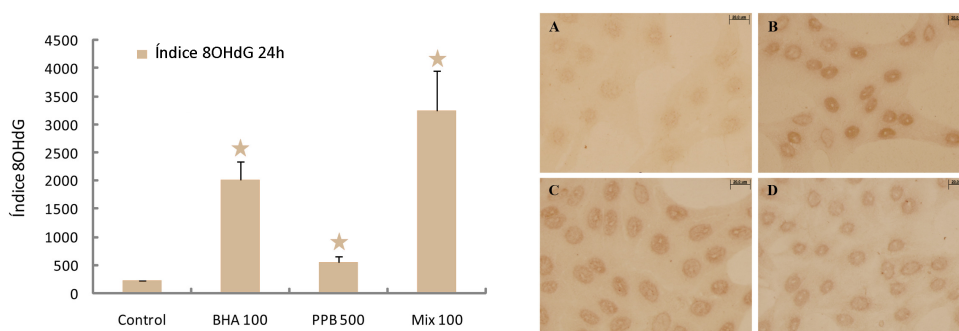


Figura 34. Detección del daño oxidativo al ADN mediante marcaje inmunocitoquímico contra 8-OHdG. Representación gráfica del índice 8-OHdG calculado para los diferentes tratamientos con BHA y/o PPB durante 24 horas. Las estrellas indican diferencias estadísticamente significativas (t-Student,  $p \leq 0.05$ ). Las imágenes de microscopía de campo claro muestran campos representativos de los cultivos control (A), *Mix 100* (B), 100  $\mu\text{M}$  de BHA (C) y 500  $\mu\text{M}$  de PPB (D). Barra 20  $\mu\text{m}$ .

Sin embargo, hay que destacar un resultado sorprendente, ya que el cultivo expuesto a 100  $\mu\text{M}$  de BHA (B), también reflejó daño oxidativo al ADN, a pesar de no producir estrés oxidativo según el ensayo de diclorofluoresceína diacetato. Con el fin de complementar esta observación, realizamos otra prueba específica para detectar la presencia de radical superóxido. Como se observa en la figura 35, la dihidroetidina (DHE) mostró una acumulación preferente en la mitocondria, como se puede ver en los controles (A). Cuando se produce estrés oxidativo mediado por anión superóxido, las células del cultivo presentan una marca nuclear roja como se puede ver tras el tratamiento con 300  $\mu\text{M}$  de BHA, que se empleó como control positivo (B-C). Los resultados obtenidos con DHE, para *Mix 100* y sus componentes individuales por separado, demostraron que la presencia de superóxido no fue significativa ni relevante (D-F).

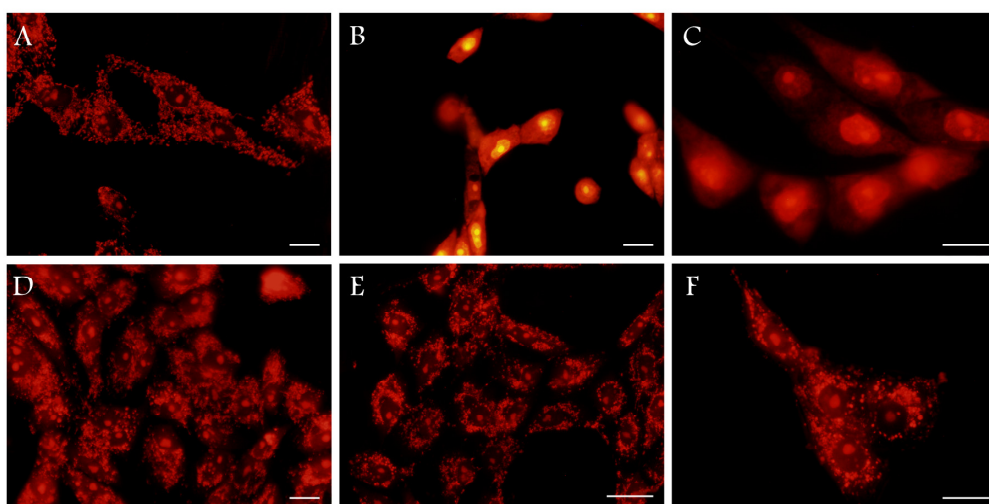


Figura 35. Imágenes representativas de la detección de anión superóxido mediante marcaje supravital con dihidroetidina, tras la exposición durante 24 horas a la combinación binaria *Mix 100* y a sus tratamientos individuales. Marcaje en células Vero control no expuestas (A). Control positivo de la prueba realizado con BHA 300  $\mu\text{M}$  (B-C). Cultivos tratados con BHA 100  $\mu\text{M}$  (D) y PPB 500  $\mu\text{M}$  (E). Células expuestas a *Mix 100* (F). Barra 20  $\mu\text{m}$ .

De cualquier modo y ante el marcaje positivo a 8-OHdG tras los diferentes tratamientos, es posible que el daño oxidativo en el ADN condujera a roturas de doble cadena y por lo tanto llevamos a cabo la inmunodetección específica con  $\gamma\text{-H2AX}$  (figura 36). Los cultivos control mostraron un porcentaje basal de células con DSB ( $5.0 \pm 1.6 \%$ ), siendo casi 6 veces superior para la combinación binaria *Mix 100* y alrededor de 2 veces para los tratamientos individuales 500  $\mu\text{M}$  de PPB y 100  $\mu\text{M}$  de BHA, que presentaban un índice de marcaje significativamente superior al del control tras 24 horas (t-Student,  $p \leq 0.05$ ). Además se analizaron los cultivos tras 4 horas de exposición a *Mix 100* y sus componentes individuales, obteniéndose incrementos en el porcentaje de células con DSB con respecto al control en todos los tratamientos, excepto para las células expuestas a propilparabeno (t-Student,  $p \leq 0.05$ ).

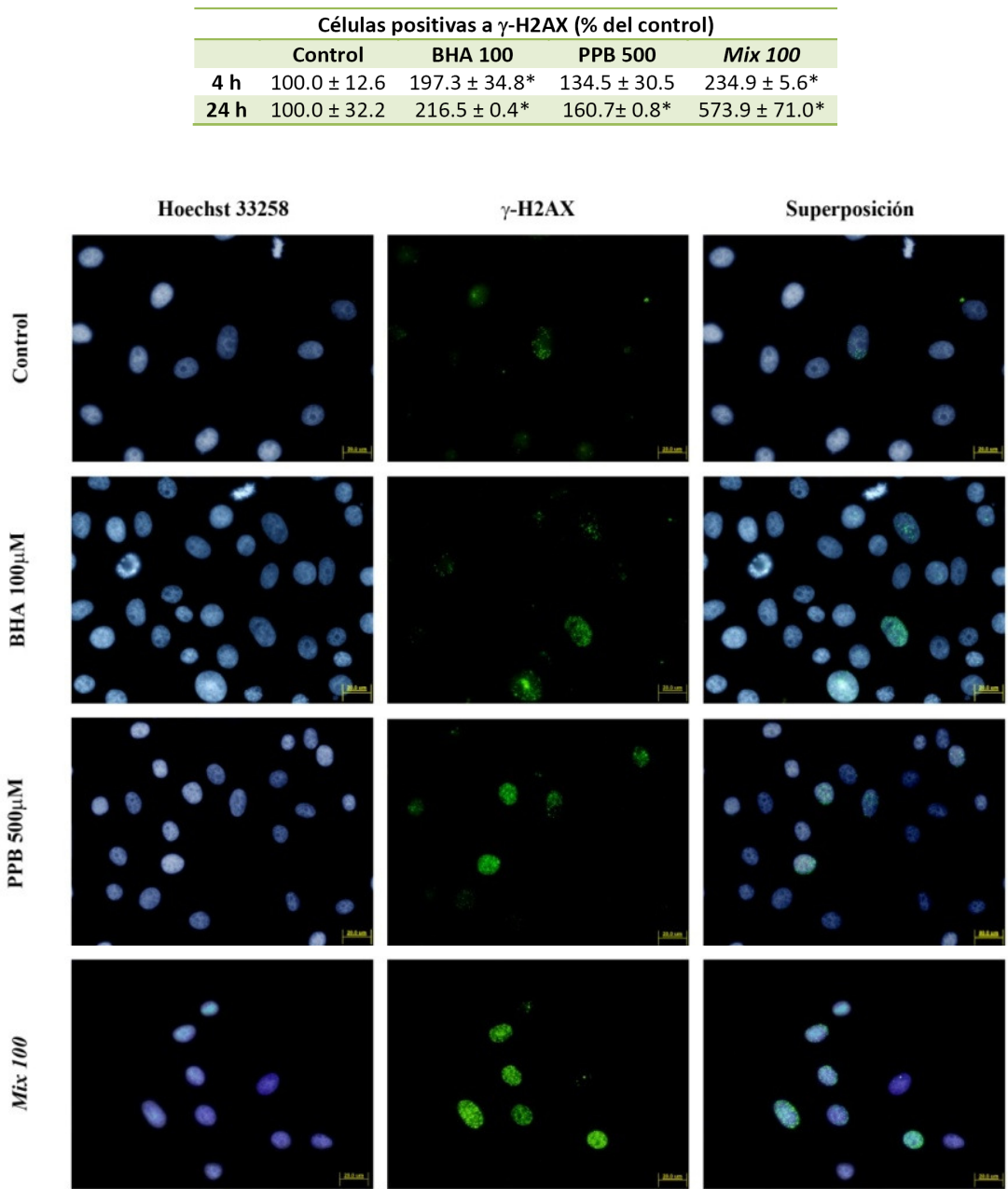


Figura 36. Detección específica de roturas de doble cadena de ADN mediante inmunofluorescencia contra  $\gamma$ -H2AX. La tabla muestra valores medios y la desviación estándar de la frecuencia de células positivas a DSB, como porcentaje respecto al control a las 4 y 24 horas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (t-Student,  $p \leq 0.05$ ). En las imágenes se muestran campos representativos de los diferentes cultivos tratados durante 24 horas. Barra 20  $\mu$ m.

### 3.3. Estudio del efecto tóxico retardado

El estudio del efecto tóxico retardado se centró principalmente en ensayos de proliferación y daño al ADN. Tras la exposición durante 24 h, se procedió a sustituir el medio con las diferentes sustancias, por medio sin drogas durante 24 y 48 horas adicionales. En ese momento se cuantificó el contenido de proteína celular total como se muestra en la figura 37. Los resultados obtenidos para la mezcla binaria *Mix 100* fueron sorprendentes, ya que si bien tras 24 horas se observaba un descenso del CPT hasta el  $39.2 \pm 15.1$  %, 24 horas más tarde sólo era el  $45.1 \pm 7.3$  %, siendo 48 h después de la retirada de las drogas el  $82.6 \pm 6.6$  %. En lo que respecta a los tratamientos individuales, 100  $\mu$ M de BHA no mostró descensos significativos para el CPT a las 24 horas de tratamiento continuo, pero mostró incrementos de proteína superiores al 20 % respecto al control 48 h después de su retirada. En el caso de los cultivos expuestos durante 24 h a 500  $\mu$ M PPB, se observó un descenso de su CPT alcanzando el  $52.4 \pm 10.3$  % y tras 48 h sin droga presentó valores como los del control  $96.7 \pm 18.5$  %. Por último, hay que resaltar que tras 72 horas de tratamiento continuo, sólo se detectó proteína en los cultivos control y tratados con BHA 100  $\mu$ M ( $71.7 \pm 10.4$  %) y PPB 500  $\mu$ M ( $8.1 \pm 2.6$  %).

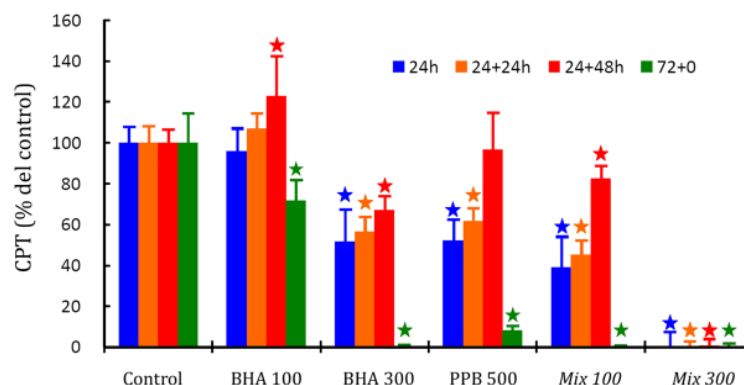


Figura 37. Cuantificación del CPT tras la exposición a diferentes tratamientos con BHA y/o PPB de forma continua durante 24 (azul) ó 72 horas (verde). Los estudios de efecto tóxico retardado se llevaron a cabo tras 24 horas de exposición continua y otras 24 ó 48 horas de exposición sin drogas (naranja y rojo respectivamente). Las estrellas indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a sus controles (t-Student,  $p \leq 0.05$ ).

Teniendo en cuenta que estos valores aparecen normalizados con respecto a sus controles, la velocidad de crecimiento de los cultivos pretratados durante 24 horas, era mucho mayor que la del control. En este momento, se diseñó un parámetro en base a los datos de CPT, que se calculó como el valor de cada tratamiento respecto al cuantificado para ese mismo grupo experimental a las 24 h. Como se ve en la figura 38, esta variable describe una gráfica de crecimiento donde la pendiente de las curvas sería una aproximación razonable a la velocidad de crecimiento del cultivo. En este caso, incluimos todos los tratamientos evaluados a lo largo del estudio excepto *Mix 300*, que no pudo analizarse debido a la pérdida del cultivo tras 24 horas.

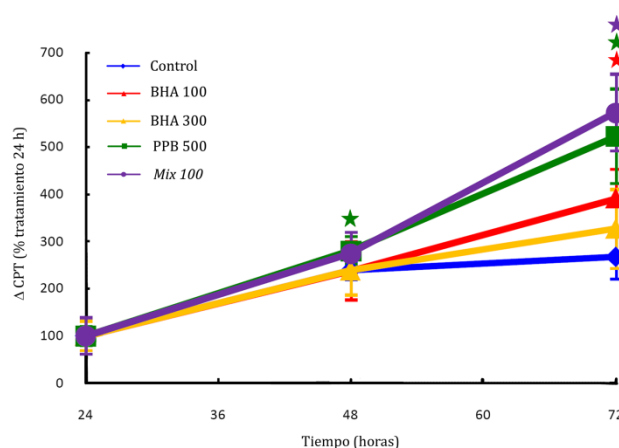


Figura 38. Normalización de la cuantificación de la proteína total del cultivo respecto al tratamiento a las 24 horas. Las estrellas indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al cultivo control en ese tiempo (t-Student,  $p \leq 0.05$ ).

De acuerdo con estos datos, hay que destacar la similitud de tendencias observadas entre las respuestas obtenidas en los cultivos expuestos a *Mix 100* y en los tratados únicamente con propilparabeno. Por otro lado, las tasas de crecimiento de todos los tratamientos eran significativamente superiores a la del control, salvo en el caso del BHA 300  $\mu\text{M}$ .

Con intención de confirmar si este incremento de la cantidad de proteína celular del cultivo estaba sustentado en la tasa de división, procedimos a realizar recuentos de índice mitótico tras 48 horas de recuperación (tabla 15). Los resultados mostraron valores en torno a dos veces los del control tanto para *Mix 100*, como para los tratamientos individuales, ratificando que los cultivos pretratados proliferan más rápidamente que los controles tras la retirada de la droga. El cultivo expuesto a BHA 300  $\mu\text{M}$  también mostró tasas de división superiores al control, aunque no tan elevadas como los otros tratamientos.

Tasa de división (%) (24+48 h)				
Control	BHA 100	BHA 300	PPB 500	Mix 100
$2.2 \pm 0.8$	$4.8 \pm 1.0^*$	$2.7 \pm 0.9$	$4.2 \pm 0.2^*$	$4.0 \pm 0.0^*$

Tabla 15. Tasa de división de los cultivos expuestos durante 24 horas a BHA y/o PPB y crecidos posteriormente en ausencia de drogas 48 horas más. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (t-Student,  $p \leq 0.05$ ).

El trabajo continuó con estudios de citometría de flujo (tabla 16) en los que pudimos observar la disminución significativa de las frecuencias de las fases G0-G1 en todos los tratamientos (BHA 100  $\mu\text{M}$ , BHA 300  $\mu\text{M}$ , PPB 500  $\mu\text{M}$  y *Mix 100*) 24 horas después de retirar la droga, incrementándose el porcentaje de células en el periodos S de los cultivos pretratados con BHA 300  $\mu\text{M}$  y *Mix 100*. Sin embargo, únicamente el G2-M de los cultivos preincubados con BHA (100 y 300  $\mu\text{M}$ ) y con la mezcla *Mix 100*, mostraron incrementos estadísticamente significativos. Tras 48 horas sin droga, se observó un descenso del número de células en G0-G1 y un incremento de las fases S y G2-M en todos los tratamientos.

Estudio del ciclo celular					
24+24 h					
	Control	BHA 100	BHA 300	PPB 500	Mix 100
<b>G0-G1</b>	60.3 ± 6.2	43.2 ± 5.8*	42.7 ± 1.7*	52.7 ± 0.4*	41.2 ± 3.7*
<b>S</b>	14.4 ± 2.1	17.5 ± 3.8	22.1 ± 1.5*	18.9 ± 3.3	22.5 ± 1.8*
<b>G2-M</b>	12.5 ± 1.4	19.4 ± 3.3*	23.3 ± 0.4*	12.9 ± 0.8	24.2 ± 1.9*
24+48 h					
<b>G0-G1</b>	69.7 ± 0.5	43.8 ± 0.4*	63.0 ± 1.8*	47.6 ± 3.5*	43.8 ± 0.6*
<b>S</b>	16.5 ± 0.3	21.4 ± 0.7*	19.7 ± 1.3*	21.9 ± 1.6*	24.2 ± 2.8*
<b>G2-M</b>	12.9 ± 0.8	17.9 ± 0.5*	15.2 ± 1.1*	16.7 ± 0.1*	16.9 ± 6.1*

Tabla 16. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo de los cultivos expuestos durante 24 horas a BHA y/o PPB y crecidos posteriormente en medio sin drogas 24 y 48 horas más. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (t-Student,  $p \leq 0.05$ ).

Todos los datos en conjunto indican que la presencia de las drogas de manera individual y combinada provoca una inhibición de la proliferación. En cambio, tras la retirada de los compuestos, las células se incorporan al ciclo celular con una tasa de división superior a la del control.

Teniendo en cuenta que se había producido un daño sobre el ADN que era el responsable de la parada de ciclo, decidimos estudiar si el daño había desaparecido con la retirada de la droga, mediante inmunodetecciones contra  $\gamma$ -H2AX. Los resultados mostraron que en general, se había producido la reparación de las roturas de doble cadena en el ADN (tabla 17). Los recuentos indicaron que la combinación binaria había reducido la tasa de células positivas a roturas de doble cadena de ADN, aunque seguía siendo superior a la de un control. Sin embargo, los tratamientos individuales (BHA 100  $\mu$ M y PPB 500  $\mu$ M) presentan un significativo descenso del porcentaje de células con dobles roturas de ADN respecto al control. En este punto hay que resaltar que los cultivos expuestos a 300  $\mu$ M de BHA presentaron un porcentaje de células positivas a  $\gamma$ -H2AX muy superior al del control, lo que explicaría su menor tasa de división.

Células positivas a $\gamma$ -H2AX (% del control)					
	Control	BHA 100	BHA 300	PPB 500	Mix 100
24 h	100.0 ± 32.2	216.5 ± 0.4*	374.8 ± 90.2*	160.7 ± 0.8*	573.9 ± 71.0*
24+24 h	100.0 ± 16.0	57.9 ± 10.5*	292.1 ± 48.7*	47.5 ± 10.0*	209.1 ± 41.4*

Tabla 17. Porcentaje de células que presentan roturas de doble cadena de ADN tras la exposición durante 24 horas a BHA y/o PPB y crecidos posteriormente en medio sin drogas 24 horas más. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (t-Student,  $p \leq 0.05$ ).

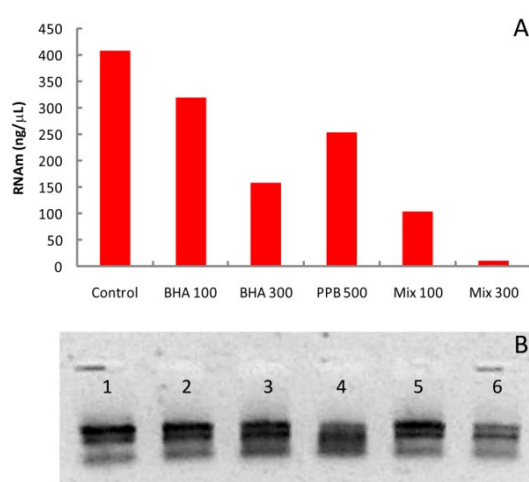
Los resultados en su conjunto indican que tras la inducción del daño y la retirada de la(s) droga(s) se incrementa la tasa de división a la vez que se reduce el porcentaje de roturas de doble cadena, incluso en *Mix 100*.



### 3.4. Aproximación -ómica del efecto combinado

Con el fin de aproximarnos a las respuestas moleculares asociadas a los efectos tóxicos producidos por las combinaciones binarias de BHA y PPB, empleamos una potente herramienta de análisis de expresión génica, basada en microarrays de ADNc. Nuestro modelo celular muestra limitaciones a la hora de este tipo de estudios, sin embargo *CholestChip<sup>TM</sup>* presenta unas características únicas que nos han permitido utilizarlo para el estudio del ciclo celular en nuestro sistema experimental. La validez de los resultados se infiere de la calidad de las señales obtenidas, bajo las mismas condiciones en las que se trabaja con secuencias procedentes de líneas celulares y pacientes humanos.

Los análisis sólo se pudieron llevar a cabo con *Mix 100*, ya que el procesamiento previo demostró que *Mix 300* inducía una grave represión de la expresión génica y no se pudo obtener suficiente cantidad de ARNm (figura 39).



Los resultados obtenidos para el microarray de ADNc mostraron que se produjeron hibridaciones en 214 genes, el 67.1% del total. De ellos, 75 (35.1%) eran secuencias relacionadas con la regulación de la proliferación, cuyo análisis realizamos por separado. En general, los datos derivados de esta técnica parecen confirmar los resultados previamente obtenidos para el tratamiento combinado (BHA 100 μM + PPB 500 μM) en los estudios de proliferación y daño al ADN empleando nuestra metodología clásica. Los genes implicados en la regulación y activación del ciclo celular, ciclinas y *CDK*, se mostraban reprimidos como consecuencia de los tratamientos con *Mix 100*. Además, se podía observar que los relacionados con puntos de control del ciclo celular y los inhibidores de *CDK* se encontraban sobreexpresados, como es el caso de *p21*. En este entramado de rutas de señalización coordinado para evitar la división celular, destacó la vía implicada en la respuesta de daño al ADN: *ATM-p53-p21* (figura 40).

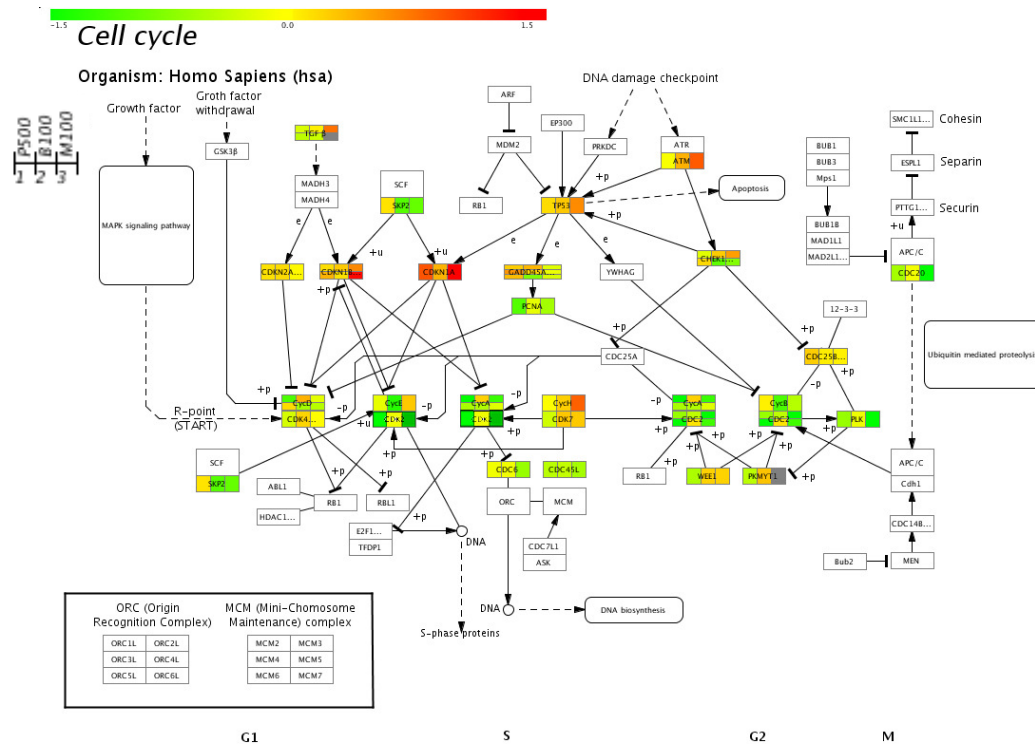


Figura 40. Esquema procedente de *Pathway explorer* en el que se muestran los diferentes genes analizados que controlan el ciclo celular, donde destacan la represión de kinasas dependientes de ciclinas y las ciclinas, junto con la sobreexpresión de ATM, p53 y p21/CDKN1A, que están implicados en la señalización del daño al ADN. Los resultados se muestran en forma de degradado de color desde el verde (represión) al rojo (sobreexpresión) en cajas de tres celdillas. La primera representa la respuesta tras el tratamiento con 500  $\mu$ M de PPB, la central muestra los cambios producidos por 100  $\mu$ M de BHA y finalmente la de la derecha refleja los resultados de la exposición a la combinación binaria *Mix 100*.

Como se puede observar en detalle en la figura 41, se produjo la represión de kinasas dependientes de ciclinas como *CDK1/CDC2*, *CDK2* y *CDK10*, de promotores y controladores del ciclo celular como *CDC20*, *CDC34*, antígeno nuclear de células proliferantes (*PCNA*), proteína 2 asociada a la kinasa de la fase S (*SKP2*) y polo like-kinasa 1 (*PLK1*), entre otros. Del mismo modo aparecen reprimidos los genes de las ciclinas A2, B1, D1 y D3. Sin embargo, existen dos genes con niveles de ARN mensajero elevados que promueven el ciclo celular, que son la ciclina E2 (*CCNE2*) y la ciclina H (*CCNH*).

Por otro lado, hay que destacar que los genes implicados en la parada de ciclo celular (*CDKN1C/p57*) y de daño al ADN (*ATM*, *p53*, *p21/CDKN1A*) presentan incrementos en los niveles de expresión. Además, el estudio del microarray nos permitió detectar cambios en la expresión de otros genes asociados con respuestas de estrés osmótico. Así por ejemplo se observaron incrementos en la expresión de *MAPK8/JNK1*, caveolinas e integrinas.



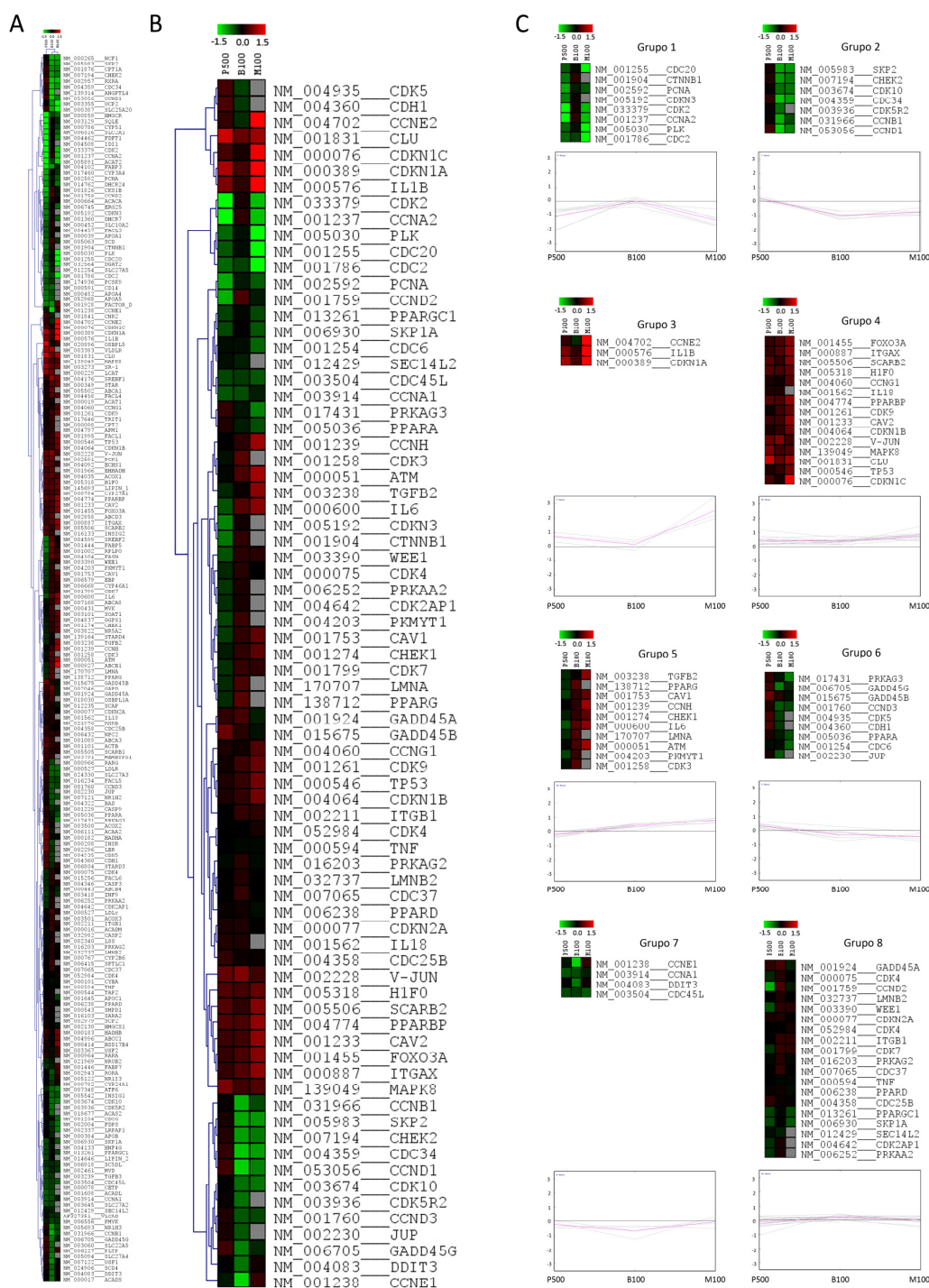


Figura 41. Análisis de la expresión génica empleando *CholestChip*™. (A) Análisis jerárquico del microarray completo. (B) análisis jerárquico que sólo incluye genes relacionados con la proliferación celular. (C) Estudio de grupos (*clusters*). Se observan grupos de genes que presentan respuestas comunes a los tres tratamientos analizados. Además se muestran las gráficas de los niveles de expresión cuantificados en el microarray y agrupados por bloques.

El siguiente paso en el análisis de la expresión génica consistió en validar el microarray. Sin embargo, esto resulta complejo debido a que no se conocen secuencias nucleares de *Chlorocebus aethiops*. Actualmente, sólo se conocen trece genes del mono verde africano, todos ellos mitocondriales. Para valorar si era viable el uso de los *primers* empleados en estudios con células humanas en nuestro modelo experimental, estimamos la homología de secuencias entre humanos y *Chlorocebus aethiops* utilizando el programa de alineamiento BLAST, que demostró que aunque no son idénticas, las trece secuencias presentan una homología superior al 70 % (tabla 18).

Homología de secuencia <i>Homo sapiens</i> vs. <i>Chlorocebus aethiops</i> (%)				
Gen	Nombre	ID <i>H. sapiens</i>	ID <i>C. aethiops</i>	Homología de secuencia (%)
<b>ATP 6</b>	Subunidad 6 de la ATP sintetasa F0	4508	3416036	49.3
<b>ATP 8</b>	Subunidad 8 de la ATP sintetasa F0	4509	3416035	64.9
<b>Cox 1</b>	Subunidad 1 de la citocromo C oxidasa	4512	3416033	80.8
<b>Cox 2</b>	Subunidad 2 de la citocromo C oxidasa	4513	3416034	80.2
<b>Cox 3</b>	Subunidad 3 de la citocromo C oxidasa	4514	3416037	79.8
<b>Cyt B</b>	Citocromo B	4519	3416031	78.5
<b>ND 1</b>	Subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa	4535	3416026	82.3
<b>ND 2</b>	Subunidad 2 de la NADH deshidrogenasa	4536	3416032	78.1
<b>ND 3</b>	Subunidad 3 de la NADH deshidrogenasa	4537	3416038	100.0
<b>ND 4</b>	Subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa	4538	3416028	79.7
<b>ND 4L</b>	Subunidad 4L de la NADH deshidrogenasa	4539	3416027	78.1
<b>ND 5</b>	Subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa	4540	3416029	78.7
<b>ND 6</b>	Subunidad 6 de la NADH deshidrogenasa	4541	3416030	78.2
<b>PROMEDIO</b>				<b>77.6</b>

Tabla 18. Estudio de la homología de secuencias entre *Chlorocebus aethiops* y *Homo sapiens* para los genes secuenciados de mono verde africano.

Por este motivo, llevamos a cabo los estudios de validación por *RT-qPCR* empleando secuencias cebadoras que se utilizan de manera rutinaria con material procedente de líneas celulares y pacientes humanos. Sin embargo, los resultados no fueron de la calidad necesaria. Como se puede observar en la figura 42, los análisis realizados sobre diferentes secuencias relacionadas con el ciclo celular, muestran que el estudio en células Vero no es posible empleando estos *primers*.

La ausencia de secuencias conocidas de mono verde africano nos hizo abordar el problema mediante la búsqueda de secuencias consenso de humano y de macaco (*Macaca mulatta*), el primate más próximo filogenéticamente a *Chlorocebus aethiops* del que se tienen datos. Sin embargo, esta labor resultó infructuosa, ya que no pudimos encontrar secuencias teóricamente útiles para realizar el estudio de *RT-qPCR* (datos no mostrados).

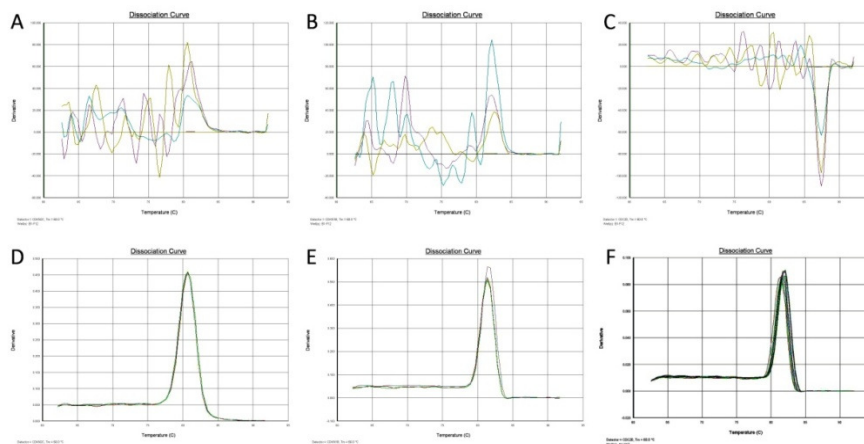


Figura 42. Estudio de PCR cuantitativa en tiempo real para llevar a cabo la validación del microarray. Las curvas de disociación para las secuencias procedentes de células Vero analizadas (*CDKN2C*, *CDKN1B* y *CDC20*) no fueron de la calidad necesaria para llevar a cabo el estudio, ya que se observan diferentes productos de reacción (A-C). En promielocitos leucémicos humanos (HL60), los cebadores funcionaron correctamente para el estudio de las mismas secuencias (D-E). Gráficas amablemente cedidas por la Dra. Lidia A. Daimiel Ruiz (Laboratorio de Microarrays del Servicio Bioquímica-Investigación del Hospital Ramón y Cajal).

Ante la situación de no poder validar el ensayo, los resultados obtenidos mediante el microarray debemos considerarlos semicuantitativos, pero se aproximan con precisión al fundamento del proceso tóxico observado, que consiste en parada de ciclo con daño al ADN. Teniendo en cuenta que los cambios en los niveles de ARNm no son en última instancia los responsables de las respuestas celulares, sino que los efectores son las proteínas, llevamos a cabo un estudio mediante western blot en el que incluimos *Mix 300*.

En base a los resultados obtenidos mediante los estudios de expresión génica, nos centramos en analizar los niveles de proteína de p53, p21, PLK1 y CCNE. Se seleccionaron estas proteínas debido a que representan cada uno de los puntos de interés que habíamos detectado con las pruebas de rutina.

Como se observa en la figura 43, los estudios de western blot demostraron que se producía un incremento significativo en la cantidad de la proteína p53 en todos los cultivos expuestos a los diferentes tratamientos. Los niveles de la proteína p21 aumentaron respecto al control en todos los tratamientos, siendo estadísticamente significativo en todos los grupos de dosis salvo para 100  $\mu$ M de BHA. Con estos resultados, se pone de manifiesto que el efecto antiproliferativo por bloqueo del ciclo celular en G0-G1 producido por la exposición a la mezcla binaria y a los compuestos individuales se debe a incrementos de p21 y de p53, que responden al daño al ADN observado.

Aunque la ausencia de figuras mitóticas en *Mix 100* puede estar relacionada con el bloqueo en el ciclo celular mediado por p21, el papel de polo-like kinasa es clave, ya que regula la entrada en mitosis, asociándose el número de células en división con el incremento de los niveles de esta proteína. Nuestros resultados indican que PLK1 presenta cantidades significativamente superiores a las detectadas en un control tras la exposición a 500  $\mu$ M de PPB y alcanzando el valor máximo en *Mix 100*. En cambio, tras el tratamiento con *Mix 300* el cultivo mostró valores significativamente menores a los cuantificados en el control.

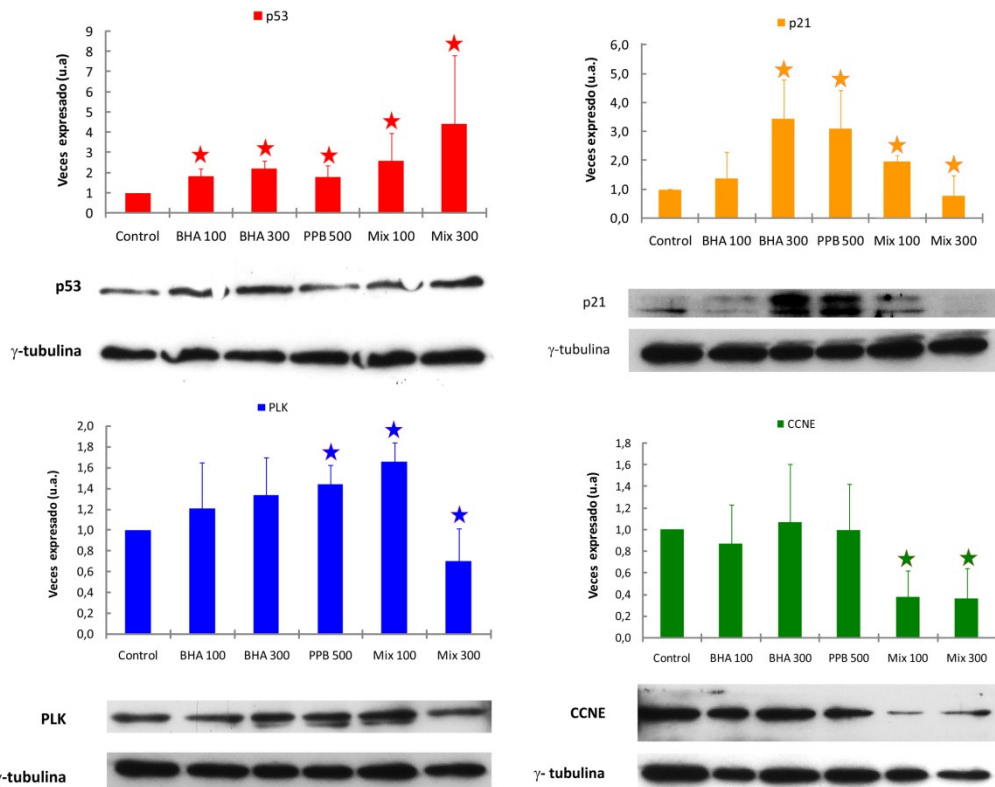


Figura 43. Cuantificación de proteínas por Western blot. Se analizaron p53, p21, PLK1 y ciclina E de los cultivos celulares expuestos a BHA y/o PPB y sus combinaciones binarias *Mix 100* y *Mix 300* tras 24 horas, empleándose como control de carga  $\gamma$ -tubulina. Las estrellas indican diferencias estadísticamente significativas con el control (t-Student,  $p \leq 0.05$ )

Por otra parte, nuestros resultados indican que el incremento en el porcentaje de células con cargas superiores a 4c que se observa en el cultivo tras 24 h de tratamiento, representa un desacoplamiento del periodo S de la interfase y la mitosis, que crea un bucle en el periodo de síntesis. En nuestras condiciones experimentales, la *CCNE*, una de las ciclinas responsables de entrada en el periodo S, presentaba cambios en la expresión génica. La isoforma 1 aparecía ligeramente reprimida, en cambio la isoforma 2 mostraba incrementos en los niveles de ARNm. Los estudios de western blot, llevados a cabo para analizar la cantidad de proteína, mostraron que los tratamientos combinados *Mix 100* y *Mix 300* indujeron una reducción de los niveles ciclina E de más de la mitad con respecto a un control, a pesar del incremento sustancial en ARNm de la isoforma E2. Sin embargo, en el resto de tratamientos no varió la cantidad de CCNE2 con respecto al control.

#### 4. Análisis matemático del efecto combinado

Para poder definir el tipo de efecto combinado (antagonismo, interacción cero o sinergia) que se obtiene tras los tratamientos realizados, llevamos a cabo la comparación entre la respuesta observada y la esperada en base a las predicciones matemáticas estimadas.

##### 4.1. Análisis del efecto combinado de la citotoxicidad basal

###### 4.1.1. Aditividad de respuestas o suma de efectos

Los resultados de los parámetros cuantitativos de citotoxicidad basal (reducción del MTT, captura de rojo neutro y contenido de proteína celular total) se analizaron para determinar si los efectos se ajustaban al modelo de correlación positiva completa. En la figura 44, se muestra que el efecto cuantificado para las mezclas 3, 4 y 6 en los parámetros de CPT y reducción del MTT son iguales a los observados en los cultivos tratados únicamente con 500  $\mu$ M de PPB, indicando que existe un buen ajuste de este modelo en estas condiciones. Sin embargo, el modelo de correlación positiva completa no mostró buen ajuste para el ensayo de captura de rojo neutro. Por último, las mezclas restantes no mostraron intensidades de efecto similares a las cuantificadas en los tratamientos individuales correspondientes.

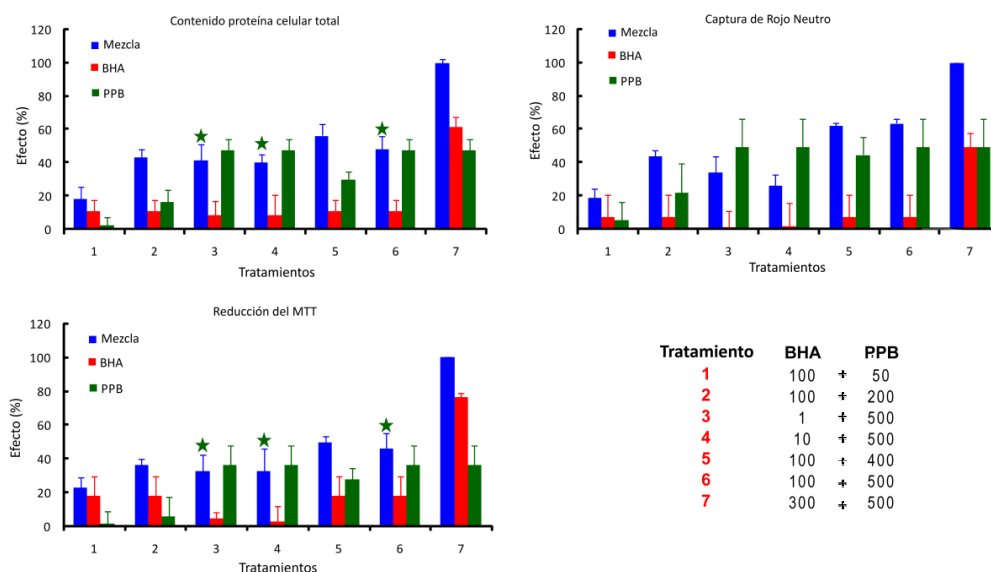


Figura 44. Análisis del efecto combinado para los ensayos de viabilidad y contenido de proteína celular total empleando modelos de correlación positiva completa. La tabla describe las concentraciones individuales que se evaluaron en cada tratamiento y que formaban parte de cada mezcla. El efecto observado en la mezcla se muestra en azul. Los inducidos por el butilhidroxianisól y el propilparabeno en rojo y verde respectivamente. Las estrellas indican un ajuste estadísticamente significativo (t-Student,  $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos combinados y alguno de los experimentos individuales.

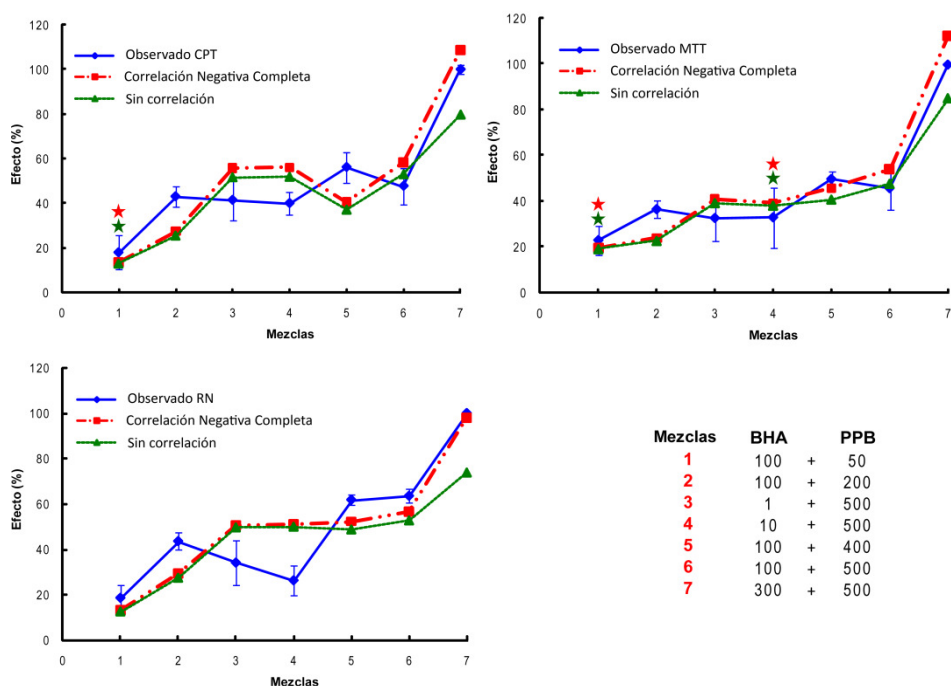


Figura 45. Análisis del efecto combinado para los ensayos de viabilidad y contenido de proteína celular total empleando modelos de aditividad de efectos (correlación negativa completa y sin correlación). La tabla describe la composición de las combinaciones binaria de BHA y PPB. El efecto observado en las mezclas se muestra en azul, las estimas en base al modelo de correlación negativa completa en rojo y las predicciones obtenidas por el modelo sin correlación en verde. Las estrellas indican un ajuste estadísticamente significativo (t-Student,  $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos combinados observados y las respuestas esperadas.

De forma general, los resultados obtenidos indicaron que ambos modelos presentan muy bajo poder predictivo en nuestras condiciones experimentales. En este sentido cabe destacar que, el ensayo de reducción del MTT fue el parámetro más predecible de los tres evaluados. En cambio, el ensayo de captura de rojo neutro resultó ser el más difícil de predecir, ya que sólo el modelo de correlación negativa completa se aproximó en su predicción para *Mix 300*, aunque no fue significativa.

#### 4.1.2. Análisis isoblográfico

Los isóbolos de las combinaciones binarias mostraron diferentes resultados en función del parámetro de estudio y de la combinación de BHA y PPB analizada como se observa en la figura 46. *Mix 300* resulta ser para todos los ensayos una mezcla con efecto sinérgico. En el caso de las combinaciones binarias BHA 100  $\mu\text{M}$  y 400 ó 500  $\mu\text{M}$  de PPB, el efecto se ajusta bien al valor estimado por el isóbolo y se puede definir como aditividad o interacción cero para todos los ensayos colorimétricos de citotoxicidad basal. El resto de mezclas responden de manera antagónica para todos los parámetros analizados, excepto BHA 100  $\mu\text{M}$  + PPB 200  $\mu\text{M}$ , que presentó efectos no interactivos para el ensayo de captura de rojo neutro y resultó sinérgica para el CPT y la reducción del MTT.



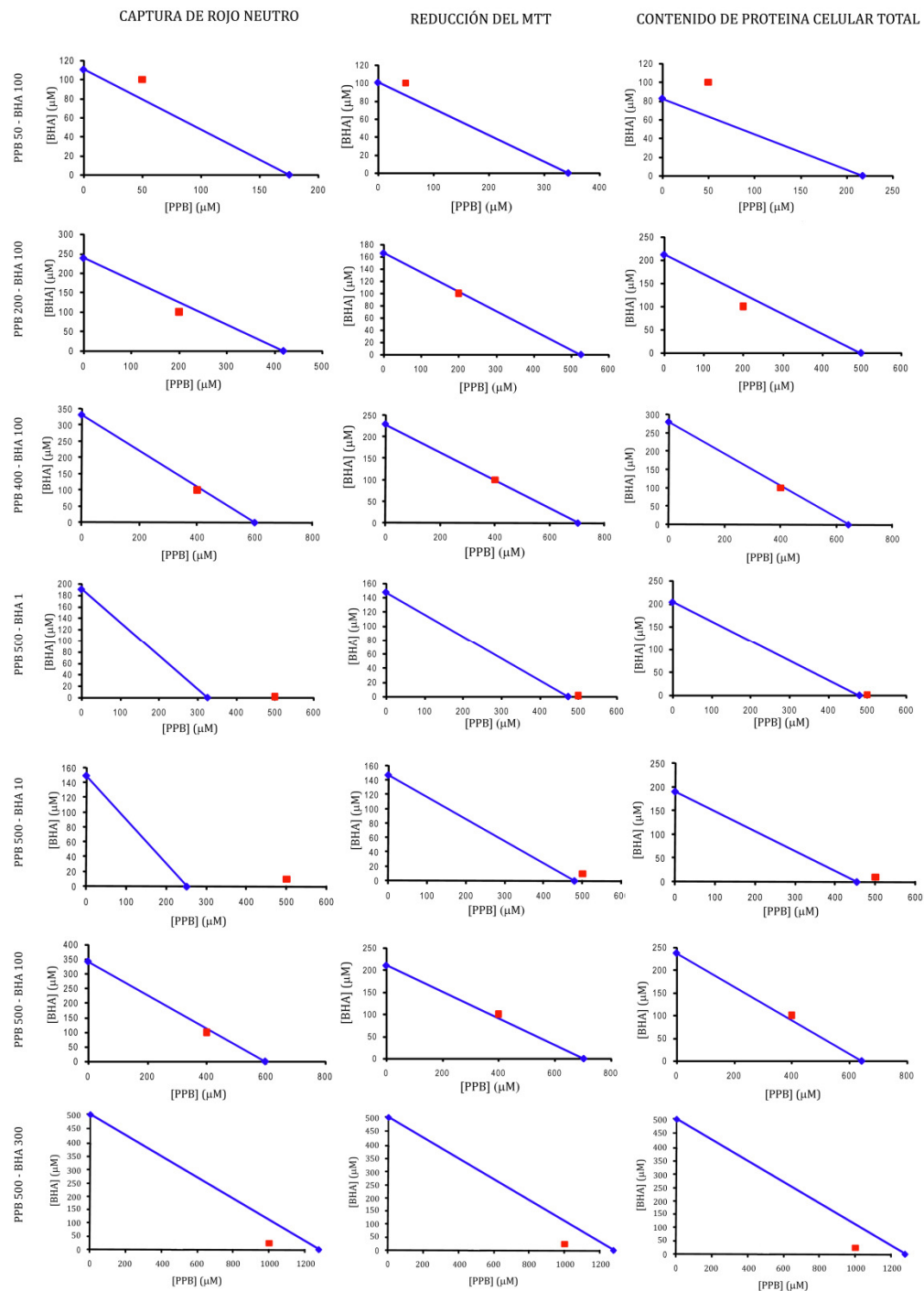


Figura 46. Análisis isoblográfico de los resultados obtenidos mediante los ensayos de citotoxicidad basal (captura de rojo neutro, reducción del MTT y CPT) para las mezclas binarias. Puntos azules concentraciones individuales que producen el mismo efecto que la combinación binaria unidas por la línea de isoeffecto (azul). El punto rojo indica las concentraciones de cada compuesto que forman parte de la combinación.

### 4.1.3. Principio de Aditividad de Loewe

A los análisis isobolográficos, se añadieron los estudios matemáticos en los que se fundamenta el Principio de Aditividad de Loewe:

$$da/Da + db/Db = 1$$

Este estudio fue algo más preciso debido al manejo de valores numéricos (tabla 19). Los valores mayores de 1 indicaron que el efecto era antagónico y se han marcado en verde. Cuando la respuesta fue sinérgica, el valor era menor de 1 y se marcó en rojo. En general, los resultados obtenidos resultan impredecibles y por lo tanto son sinérgicos o antagónicos. Sin embargo, cuando el valor obtenido fue 1, se consideró efecto aditivo o interacción cero y se marcó en negro. El parámetro cuyo efecto observado se ajusta mejor a los valores estimados fue la reducción del MTT y la mezcla con la respuesta más predecible fue la combinación binaria BHA 100 + PPB 400.

Principio de Aditividad de Loewe			
Combinación binaria	RN	MTT	CPT
BHA 100 + PPB 50	1.2	1.1	1.4
BHA 100 + PPB 200	0.9	1.0	0.9
BHA 100 + PPB 400	1.0	1.0	1.0
BHA 100 + PPB 500	1.1	1.2	1.3
BHA 1 + PPB 500	1.5	1.1	1.1
BHA 10 + PPB 500	2.1	1.1	1.2
BHA 300 + PPB 500	0.6	0.6	0.9

Tabla 19. Análisis del efecto combinado de los parámetros de citotoxicidad basal empleando el Principio de Aditividad de Loewe. Casillas marcadas en verde indican antagonismo, en negro interacción cero y en rojo sinergia. El número representa el valor de interacción (I) descrito por Loewe y Muischnek (1926).

### 4.1.4. Análisis de pendientes

También empleamos la comparación de pendientes de las curvas dosis-respuesta de la mezcla frente a un rango de dosis de un compuesto por separado. Este método resulta muy complejo matemáticamente, ya que se fundamenta en derivadas parciales de las funciones, sin embargo la valoración gráfica resulta muy visual.

Para las mezclas que contenían PPB 500  $\mu$ M y un rango creciente de dosis de BHA (figura 47), se puede observar que las curvas dosis-respuesta individuales (azul) y combinadas (roja) de los ensayos de reducción del MTT (A) y CPT (B) presentan tendencias muy similares y varían únicamente en la intensidad basal del efecto. Por lo tanto, podemos decir que en general no hay efectos combinados en las mezclas evaluadas con estos dos parámetros, ya que sus tendencias (pendientes) apenas varían respecto de la individual. Sin embargo, para la captura de rojo neutro (C) se observa un claro cambio de pendiente, describiéndose una tendencia totalmente diferente a la que presenta el tratamiento con BHA por separado. Por lo tanto, el parámetro de captura de rojo neutro mostró efecto combinado no aditivo para las diferentes combinaciones binarias de BHA y PPB.



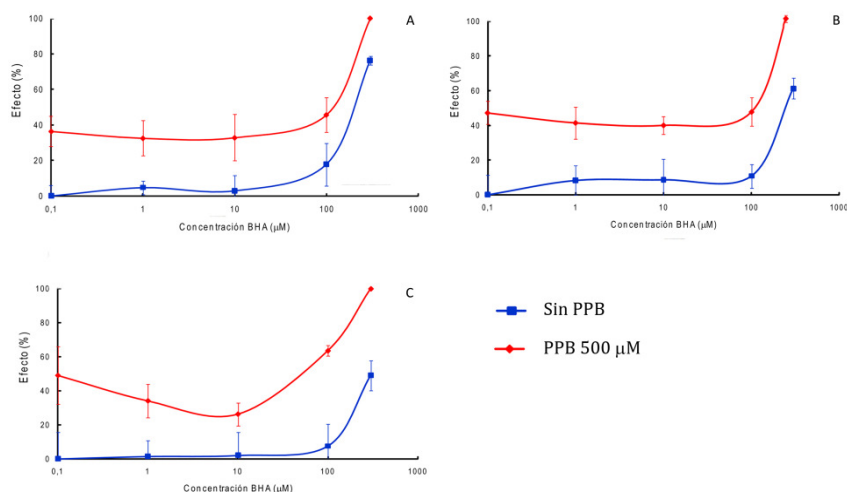


Figura 47. Análisis gráfico de pendientes para las mezclas binarias compuestas por un rango de dosis de BHA y una dosis fija de PPB (500  $\mu$ M) a las 24 horas. La gráfica (A) representa los datos del ensayo de reducción del MTT, (B) el CPT y (C) captura de rojo neutro. La serie azul muestra la curva de efecto del rango de concentraciones de BHA y la serie roja la combinación de BHA y 500  $\mu$ M de PPB.

Los tratamientos combinados en los que se mezclaban distintas concentraciones de propilparabeno con 100  $\mu$ M de BHA también fueron analizados empleando este mismo tipo de análisis. Los resultados indicaron que, de manera general, estas mezclas no variaron su tendencia en ningún parámetro evaluado con respecto a la que presentan en tratamientos individuales (figura 48). Sin embargo, hay que destacar los resultados obtenidos en la mezcla BHA 100  $\mu$ M + PPB 500  $\mu$ M ya que, aunque para el ensayo de rojo neutro no presentó cambios en la pendiente de la curva respecto a la del tratamiento individual, sí lo hizo para los parámetros de reducción del MTT y de contenido de proteína celular total. Con este resultado se puede concluir que en estos dos casos, el efecto observado no es aditivo empleando este modelo matemático y por lo tanto, tampoco es predecible.

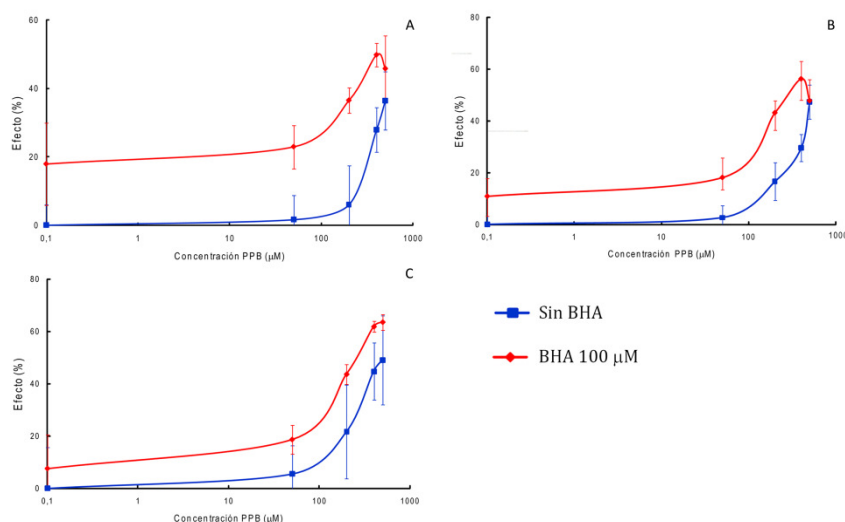


Figura 48. Análisis gráfico de pendientes para las mezclas binarias compuestas por un rango de dosis de PPB y una dosis fija de BHA (100  $\mu$ M). La gráfica (A) representa los datos del ensayo de reducción del MTT, (B) el CPT y (C) captura de rojo neutro. La serie azul muestra la curva de efecto del rango de concentraciones de PPB y la serie roja la combinación de PPB y 100  $\mu$ M de BHA.

## Resultados

Parece evidente que la predicción matemática del efecto combinado empleando modelos de estima sencillos resulta poco eficaz. Como se muestra en la tabla 20, los resultados marcados en negro (respuestas predichas correctamente) son escasos. Además, ante los mismos datos observados para los individuales, hemos obtenido diferentes tipos de efecto combinado (sinergia o antagonismo) según el modelo utilizado.

Ensayo	Modelo	Dosis (BHA+PPB)						
		100+50	100+200	100+400	100+500	1+500	10+500	300+500
RN	C.P.C (BHA)	S	S	S	S	S	S	S
	C.P.C (PPB)	S	S	S	S	A	A	S
	C.N.C.	S	S	A	A	S	S	0
	S.C.	S	S	A	A	S	S	S
	Isóbolo	A	0	0	0	A	A	S
	P. A. Loewe	A	S	0	A	A	A	S
	Pendientes	0	0	0	0	A	A	0
MTT	C.P.C (BHA)	S	S	S	S	S	S	S
	C.P.C (PPB)	S	S	S	S	A	A	S
	C.N.C.	0	S	S	A	A	0	A
	S.C.	0	S	S	0	A	0	S
	Isóbolo	A	S	0	0	A	A	S
	P. A. Loewe	A	0	0	A	A	A	S
	Pendientes	0	0	0	0-A	0	0	0
CPT	C.P.C (BHA)	S	S	S	S	S	S	S
	C.P.C (PPB)	S	S	S	0	A	A	S
	C.N.C.	0	S	S	A	A	A	A
	S.C.	0	S	S	A	A	A	S
	Isóbolo	A	S	0	0	A	A	S
	P. A. Loewe	A	S	0	A	A	A	S
	Pendientes	0	0	0	0-A	0	0	0

Tabla 20. Balance del análisis del efecto combinado. Los resultados obtenidos en los tres ensayos colorimétricos de citotoxicidad basal para las siete mezclas binarias evaluadas se estimaron empleando siete modelos predictivos (C.P.C.: Correlación Positiva Completa; C.N.C.: Correlación Negativa Completa; S.C.: Sin Correlación; Isóbolo; P.A. Loewe: Principio de Aditividad de Loewe; Pendientes: Análisis de Pendientes de Südhel. En verde se presentan los tratamientos efectos antagónicos (A), en negro los que respondieron de manera aditiva (0) y en rojo los que mostraron sinergia (S). Las casillas marcadas en verde oscuro (0-A) presentan resultados no concluyentes entre la aditividad y el antagonismo. (t-Student,  $p \leq 0.05$ ).

### 4.2. Análisis de parámetros de relevancia mecanística

Se eligieron tanto parámetros cuantitativos como cualitativos para estimar la predicción del daño en las combinaciones binarias, empleando modelos matemáticos basados en la suma de efectos.

#### 4.2.1. Adhesión celular

Los estudios de efecto combinado para adhesión celular, fueron llevados a cabo empleando, como variable de efecto, el porcentaje de células que aparecían desprendidas del sustrato. Como se muestra en la figura 49, es imposible predecir un efecto de esa magnitud tras la exposición combinada a *Mix 100* durante 24 h, en base a los resultados individuales. Teniendo en cuenta que el tratamiento con BHA 100  $\mu\text{M}$  no produce efecto, lo esperable según los tres modelos utilizados (correlación positiva completa, negativa completa y sin correlación), es que el porcentaje de células en suspensión sea similar al obtenido con la exposición individual de PPB y el resultado observado para la mezcla binaria es más de dos veces superior.

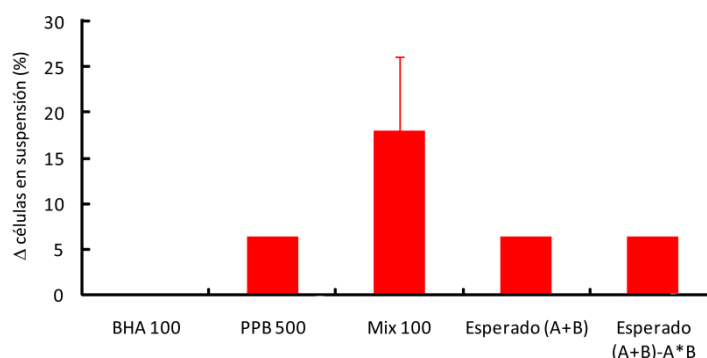


Figura 49. Estimación del incremento de células en suspensión tras 24 horas de exposición a *Mix 100*. Ningún modelo presentó buen ajuste (t-Student,  $p \leq 0.05$ ).

*Mix 300* tampoco mostró buen ajuste para ninguno de los tres modelos empleados. En la figura 50, se puede observar que el porcentaje de células que perdió la adhesión al sustrato tras 9 horas resulta impredecible, ya que alcanza valores de  $41.0 \pm 0.0$  %, cuando los tratamientos individuales (BHA 300  $\mu\text{M}$  y PPB 500  $\mu\text{M}$ ) no muestran efecto sobre el cultivo. Cuando el tratamiento llegó a las 24 h, los tratamientos por separado incrementaron la pérdida de adhesión del cultivo, pero el porcentaje de células en suspensión observado en la mezcla ( $86.6 \pm 9.6$  %) supera con mucho el esperado (27.9 %). Tras 48 horas, las diferencias entre esperado y observado se acortaron mucho, aunque continuaron resultando muy diferentes.

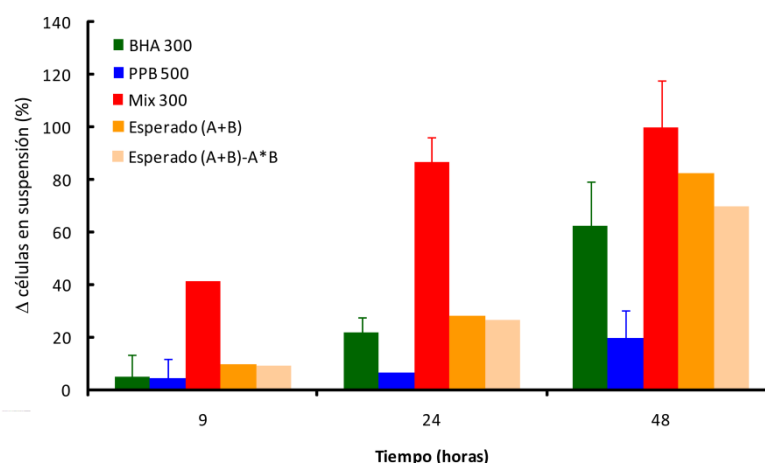


Figura 50. Estimación del incremento de células en suspensión tras diferentes tiempos de tratamiento con *Mix 300*. Ninguno de los modelos empleados presentó buen ajuste (t-Student,  $p \leq 0.05$ ).

#### 4.2.2. Ciclo celular

Para evaluar el efecto combinado tras la exposición a *Mix 100*, se llevó a cabo la modelización matemática del efecto esperado utilizando los resultados obtenidos en el estudio de citometría de flujo. Para facilitar las estimas, los porcentajes cuantificados para los estudios de contenido de ADN se transformaron en la variable  $E_i$ , que es el “incremento del porcentaje de células respecto al control” y representa la diferencia entre el valor de cada experimento  $((Ex)_i)$  y la media del control ( $E_c$ ).

$$E_i = (Ex)_i - (Ec)$$

En la figura 51 se muestran las comparaciones entre los modelos de estima de correlación negativa completa y sin correlación. En la gráfica que representa la fase G0-G1, se muestra que los tres modelos presentaron un buen ajuste frente a los cuantificados para *Mix 100*. La respuesta que se observó con el tratamiento de 500  $\mu$ M de PPB es prácticamente idéntica a la que se produce en presencia de la mezcla. Por otro lado, los otros dos modelos que estiman el efecto combinado en base a la suma de ambas respuestas, apenas variaron del observado para el PPB. Todos estos resultados indican que el efecto de esta mezcla se debe a la presencia de PPB, algo razonable, ya que el efecto individual del butilhidroxianisol es nulo. Algo similar ocurre para la fase S, donde el modelo de correlación positiva completa en base a la respuesta con 500  $\mu$ M de PPB, se ajusta mejor que el de correlación negativa completa, ya que tanto éste, como el modelo sin correlación sobreestiman el efecto esperado. En el caso de la fase G2-M, el ajuste no fue bueno con ninguno de los modelos empleados, pero el valor del efecto observado para *Mix 100* quedó entre lo previsto por el modelo de correlación positiva completa del PPB y el estimado por el de correlación negativa completa.

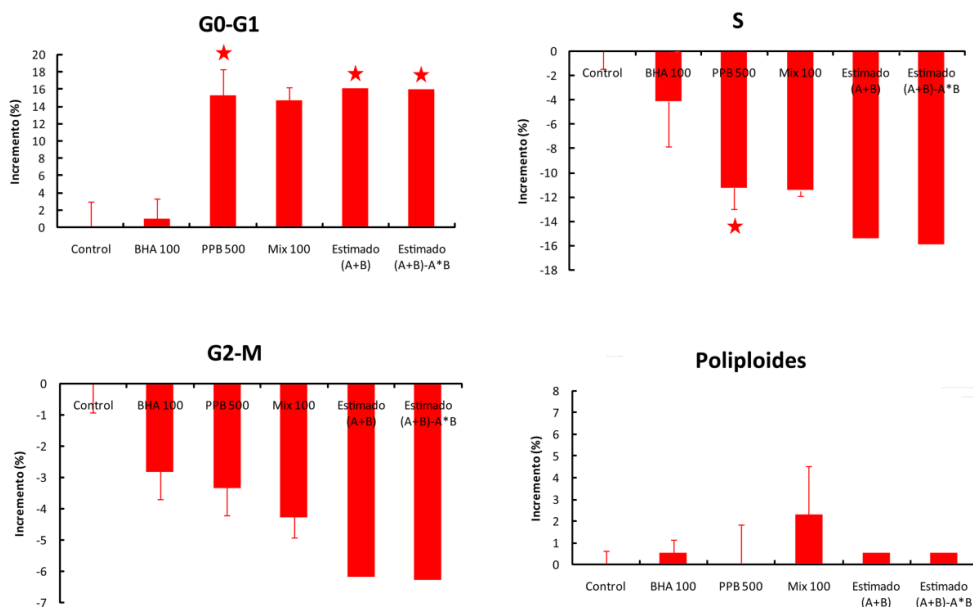


Figura 51. Predicción del efecto combinado mediante diferentes modelos de estima (correlación positiva completa, correlación negativa completa y sin correlación) para cada una de las fases del ciclo celular a las 24 horas de exposición a BHA y/o PPB. Las estrellas indican un ajuste estadísticamente significativo del modelo con el valor observado para *Mix 100* (t-Student,  $p \leq 0.05$ ).

Finalmente, se analizó la fracción de células con cargas de ADN superiores a 4c (poliploides). Ningún modelo pudo predecir el incremento del porcentaje de este tipo de células, ya que por separado no las produce ninguno de los compuestos.

La combinación binaria *Mix 300* provocó grandes cambios en los perfiles de los histogramas de ciclo celular. En este caso, analizamos estos datos con el fin de determinar si eran predecibles con los modelos clásicos de estima (figura 52). Los resultados obtenidos para la mezcla indicaban reducción de la fase G0-G1 con respecto al control, sin embargo los tratamientos individuales mostraron incrementos en ella tanto para 300  $\mu$ M de BHA como para 500  $\mu$ M de PPB. Por lo tanto, los modelos basados en aditividad de respuestas no pudieron prever dicho efecto y se ajustaron mal a la realidad observada. Por otro lado, el

porcentaje de células en el periodo S de la interfase se incrementó en los cultivos expuestos a *Mix 300*. Por el contrario, se redujo con los tratamientos individuales, resultando del mismo modo impredecible. En cuanto a la reducción del porcentaje de células en la fase G2-M que se produce en los tratamientos individuales, también fue patente en la combinación binaria. A pesar de ello, los resultados obtenidos para esta fase presentaron muy mal ajuste con los predichos para el tratamiento con *Mix 300*, ya que los modelos estimaron mayores reducciones en la respuesta de la mezcla.

Por último y como ocurre con otros parámetros del ciclo celular estudiados con *Mix 300*, la proporción de poliploides en el cultivo fue impredecible, ya que los tratamientos individuales no mostraron cambios en este sentido.

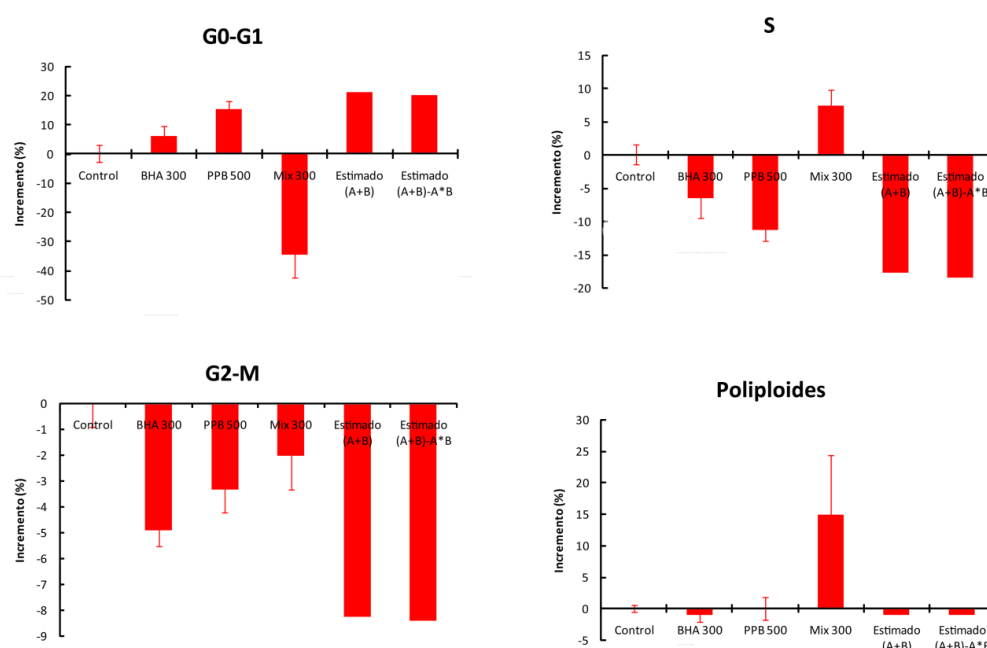


Figura 52. Predicción del efecto combinado empleando diferentes modelos de estima (correlación positiva completa, correlación negativa completa y sin correlación) para cada una de las fases del ciclo celular a las 24 horas de exposición a BHA y/o PPB. Ningún modelo predictivo estimó los efectos de *Mix 300* (t-Student,  $p \leq 0.05$ ).

#### 4.2.3. Daño genotóxico

##### 4.2.3.1. Daño oxidativo al ADN

Los resultados permitieron estimar el efecto esperado utilizando diferentes herramientas de predicción (figura 53). Se aplicaron los modelos de correlación positiva completa y negativa completa, así como una modificación de éste último que se aplica frecuentemente en estudios de genotoxicidad y que considera el nivel basal de daño como parte del efecto esperado, por lo tanto:

$$E(A+B) = E(A) + E(B) + E(\text{Control})$$

En nuestro sistema experimental, sólo el modelo modificado de correlación negativa completa se ajustó a los resultados obtenidos para *Mix 100* en 24 h. Sin embargo, el efecto inducido por *Mix 300* tras 4 horas, únicamente fue estimado con precisión por el modelo de correlación positiva completa en base a los datos de BHA 300  $\mu\text{M}$ . El resto de ecuaciones predictivas sobreestimaron el efecto observado.

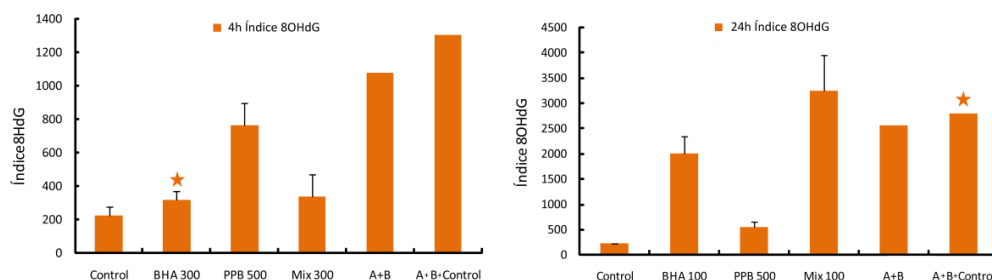


Figura 53. Predicción del efecto combinado para el índice 8-OHdG tras la exposición a *Mix 300* 4 horas (izquierda) y *Mix 100* 24 horas (derecha). Las estrellas indican un ajuste estadísticamente significativo de la estima con el efecto observado en la mezcla. (t-Student para una muestra,  $p \leq 0.05$ ).

#### 4.2.3.2. Roturas de doble cadena de ADN

El análisis de los resultados obtenidos para *Mix 100* (4 y 24 h) y *Mix 300* (4h) demostró que la capacidad predictiva de los diferentes modelos es muy limitada (figura 54). El efecto obtenido en el tratamiento de 4 h con *Mix 100* sólo se pudo predecir con el modelo de correlación positiva completa (BHA 100  $\mu\text{M}$ ). Esta misma mezcla a las 24 h mostró sinergia, excepto con el modelo de suma de efectos modificado, que estimó con precisión la respuesta esperada. Por último, en el caso de *Mix 300* 4 h, el efecto observado fue estadísticamente igual al estimado por los dos modelos de aditividad.

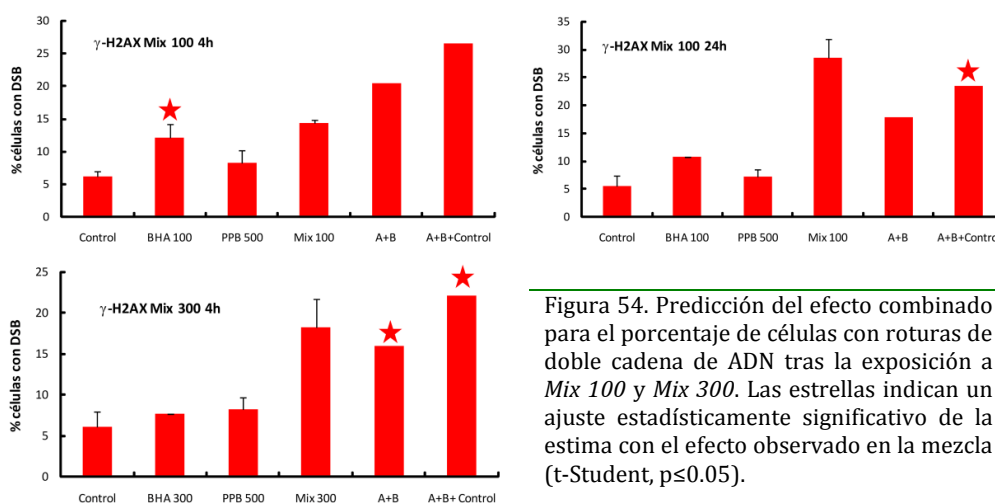


Figura 54. Predicción del efecto combinado para el porcentaje de células con roturas de doble cadena de ADN tras la exposición a *Mix 100* y *Mix 300*. Las estrellas indican un ajuste estadísticamente significativo de la estima con el efecto observado en la mezcla (t-Student,  $p \leq 0.05$ ).

Con estos resultados, es evidente que el efecto de las mezclas empleando parámetros de relevancia mecanística es impredecible, aunque en general, las estimas han sido más homogéneas que para la citotoxicidad basal. La tabla 21 indica que para estos marcadores de efecto, las mezclas *Mix 100* y *Mix 300* muestran efectos mucho mayores que los estimables con los modelos sencillos clásicos.

Parámetro	Modelo	Tiempo	Dosis (BHA-PPB)	
			100+500	300+500
Adhesión	C.P.C. (BHA)	9h	n.a.	S
	C.P.C. (PPB)	9h	n.a.	S
	C.N.C.	9h	n.a.	S
	S.C.	9h	n.a.	S
Adhesión	C.P.C. (BHA)	24h	S	S
	C.P.C. (PPB)	24h	S	S
	C.N.C.	24h	S	S
	S.C.	24h	S	S
Adhesión	C.P.C. (BHA)	48h	n.a.	S
	C.P.C. (PPB)	48h	n.a.	S
	C.N.C.	48h	n.a.	S
	S.C.	48h	n.a.	S
G0-G1	C.P.C. (BHA)	24h	S	A
	C.P.C. (PPB)	24h	0	A
	C.N.C.	24h	0	A
	S.C.	24h	0	A
S	C.P.C. (BHA)	24h	A	S
	C.P.C. (PPB)	24h	0	S
	C.N.C.	24h	S	S
	S.C.	24h	S	S
G2-M	C.P.C. (BHA)	24h	A	S
	C.P.C. (PPB)	24h	A	S
	C.N.C.	24h	S	S
	S.C.	24h	S	S
Poliploides	C.P.C. (BHA)	24h	S	S
	C.P.C. (PPB)	24h	S	S
	C.N.C.	24h	S	S
	S.C.	24h	S	S
Índice 80HdG	C.P.C. (BHA)	4h	n.a.	0
	C.P.C. (PPB)	4h	n.a.	A
	C.N.C.	4h	n.a.	A
	C.N.C. Modificado	4h	n.a.	A
Índice 80HdG	C.P.C. (BHA)	24h	S	n.a.
	C.P.C. (PPB)	24h	S	n.a.
	C.N.C.	24h	S	n.a.
	C.N.C. Modificado	24h	0	n.a.
Índice de DSB	C.P.C. (BHA)	4h	0	S
	C.P.C. (PPB)	4h	S	S
	C.N.C.	4h	A	0
	C.N.C. Modificado	4h	A	0
Índice de DSB	C.P.C. (BHA)	24h	S	n.a.
	C.P.C. (PPB)	24h	S	n.a.
	C.N.C.	24h	S	n.a.
	C.N.C. Modificado	24h	0	n.a.

Tabla 21. Balance del análisis del efecto combinado en parámetros de relevancia mecánica en *Mix 100* y *Mix 300*. Los resultados obtenidos se estimaron empleando diferentes modelos predictivos (C.P.C.: Correlación Positiva Completa; C.N.C.: Correlación Negativa Completa; S.C.: Sin Correlación; C.N.C. Modificado: Correlación Negativa Completa Modificado. En verde se presentan los tratamientos con efectos antagónicos (A), en negro los que respondieron de manera aditiva (0) y en rojo los que mostraron sinergia (S) (t-Student,  $p \leq 0.05$ ). n.a. No analizado.

#### 4.3. Análisis matemático del efecto combinado retardado

Los resultados obtenidos en la evaluación del efecto tóxico retardado para *Mix 100* fueron analizados con el fin de determinar si estas respuestas son sinérgicas, predecibles o antagónicas, utilizando los modelos clásicos de estima del efecto combinado.

En la figura 55, se muestran las gráficas que comparan los efectos observados y estimados de los parámetros de proliferación más relevantes que se analizaron en este apartado. Los efectos predichos para el incremento del CPT muestran mal ajuste con nuestras observaciones para *Mix 100* tanto en el estudio a 24+24 como en el de 24+48 horas (A). Únicamente se obtuvieron respuestas similares a las estimadas por el modelo de correlación positiva completa en base en los resultados obtenidos con 500  $\mu$ M de PPB después de 48 horas de recuperación. A pesar de ello, sobre estos datos no se pudieron realizar los análisis estadísticos pertinentes debido a que durante la construcción de la variable se perdían las desviaciones estándar, por lo que la gráfica no presenta barras de error, ni estrellas. Por otro lado, *Mix 100* indujo alteraciones sobre el ciclo celular (G2-M) que presentaron buen ajuste con los modelos de correlación negativa completa y sin correlación en los tratamientos 24+48 horas, aunque no fueron predecibles en los tratamientos 24+24 h (B). Finalmente, las predicciones sobre la frecuencia de células positivas a  $\gamma$ -H2AX (C) no fueron muy acertadas con los modelos clásicos. Únicamente con la ecuación basada en la correlación negativa completa modificada para parámetros de genotoxicidad se obtuvo una estima de efecto correcta.

Por lo tanto, con estos resultados concluimos que no hay buen ajuste entre las respuestas observadas y las predichas en nuestro análisis del efecto tóxico combinado retardado, siendo los tratamientos a 24+48 horas los que resultan más predecibles.

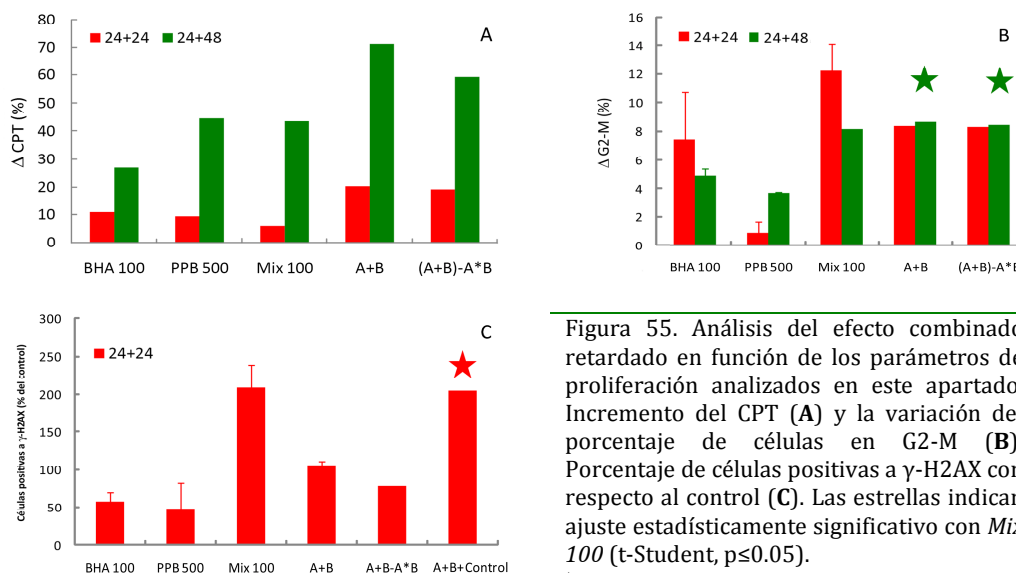


Figura 55. Análisis del efecto combinado retardado en función de los parámetros de proliferación analizados en este apartado. Incremento del CPT (A) y la variación del porcentaje de células en G2-M (B). Porcentaje de células positivas a  $\gamma$ -H2AX con respecto al control (C). Las estrellas indican ajuste estadísticamente significativo con *Mix 100* (t-Student,  $p \leq 0.05$ ).



#### 4.4. Parámetros no cuantitativos

Los análisis de efecto combinado únicamente se pueden realizar empleando parámetros cuantitativos, ya que sólo cuando se trata de variables numéricas se puede aplicar un modelo matemático a los datos obtenidos. En nuestro estudio, existen multitud de parámetros que carecen de una escala numérica. Sin embargo, podemos emplear un sistema de análisis que hemos denominado asociación de efectos, basado en el modelo de correlación positiva completa. Buscamos las dosis individuales de los compuestos que producen el mismo efecto que el observado en una mezcla y aplicamos los mismos criterios para definir el tipo de efecto combinado.

Este análisis se aplicó sobre diferentes parámetros del estudio morfológico en los tratamientos *Mix 100* y *Mix 300*. Nuestros resultados mostraron diversas alteraciones de los cultivos expuestos a las mezclas que se observaron en tratamientos individuales con 300  $\mu$ M de BHA durante 24 horas (figura 56), como vacuolización, fragmentación mitocondrial, aparente descenso del potencial de membrana mitocondrial y reducción de fibras de estrés. Sin embargo, otras alteraciones como el aspecto dendrítico de las células de los cultivos expuestos a las mezclas, no se observaron bajo ninguna condición individual estudiada.

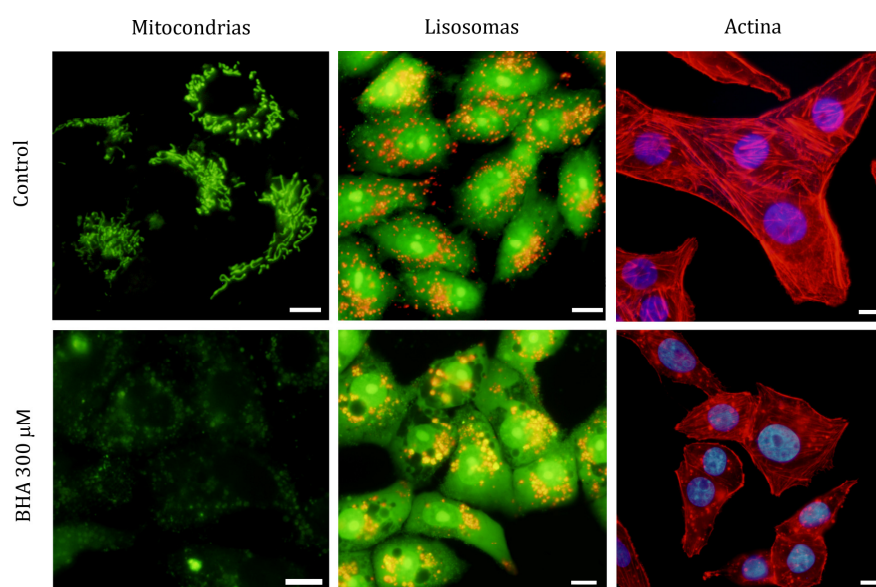


Figura 56. Efectos del tratamiento con 300  $\mu$ M de BHA sobre el retículo mitocondrial, el compartimento endosomal, el citosol y el citoesqueleto de actina visualizados mediante detecciones específicas con rodamina 123, naranja de acridina y faloidina conjugada con TRITC. Barra 10  $\mu$ m.

Del mismo modo y como se muestra en la figura 57, los estudios de expresión génica mostraron que existen grupos de genes en los que se puede relacionar el efecto de la mezcla con la respuesta obtenida en un compuesto por separado. Esto permite responsabilizar del efecto observado en la combinación binaria a una de las dos sustancias (A-C). Por lo tanto, para ellos el efecto en la mezcla está asociado a la toxicidad de uno de los compuestos. En este análisis también se obtuvo un grupo de genes que presentaban la misma tendencia de cambio para las tres condiciones analizadas (D) y otros en los que la mezcla producía un efecto de sobreexpresión (E) y los tratamientos individuales inducían efectos diferentes entre sí.

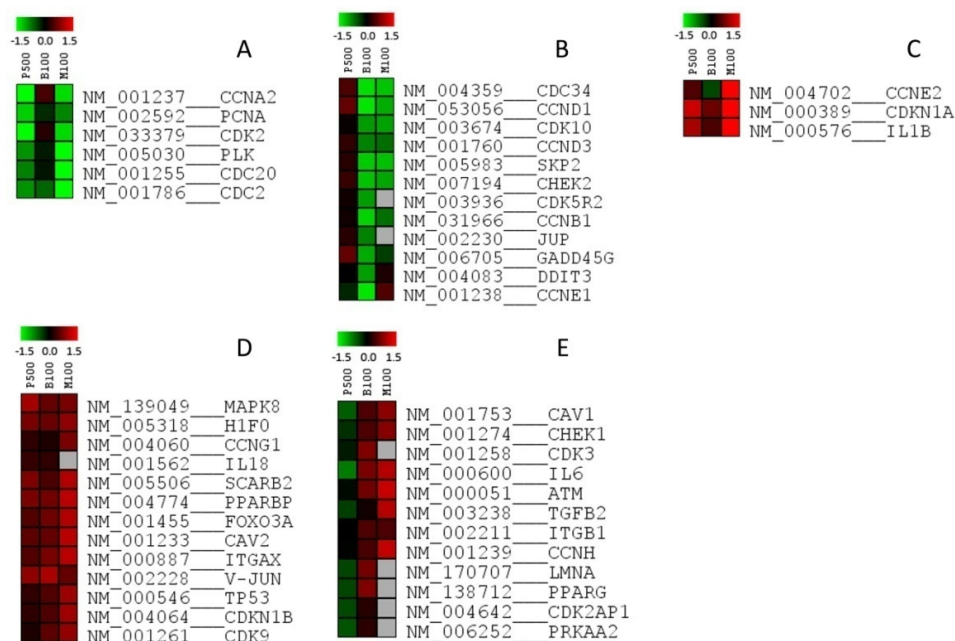


Figura 57. Asociación de efectos en el análisis de expresión génica con *CholestChip™*. Los distintos grupos de genes cuyas respuestas tras la exposición a la mezcla se deben únicamente a una de las dos sustancias (A-C), a la aditividad de ambas de ellas (D) o a su combinación (E).

#### 4.5. Predecibilidad de los efectos tóxicos

Tomando los datos de citotoxicidad basal y de relevancia mecanística en su conjunto, los efectos causados por las distintas combinaciones binarias de BHA y PPB son en general impredecibles (sinergia-rojo; antagonismo-verde), ya que en su mayoría se alejan de efectos aditivos (interacción cero-negro). Hay que destacar que los modelos predictivos pueden realizar estimas muy diferentes entre ellos, incluso a partir de los mismos datos. A pesar de esto, *Mix 300* presenta efectos impredecibles y homogéneos, ya que en la mayoría de los casos su efecto resulta mayor que los estimados.

Una tarea de gran interés en el análisis de los efectos tóxicos combinados es determinar cómo de predecible es el daño que produce la mezcla sobre el modelo biológico. En base a nuestros resultados y aplicando diferentes modelos de estima, los efectos inducidos por las combinaciones binarias resultan impredecibles de manera general. A pesar de esto, analizamos nuestros resultados con el fin de precisar el modelo más útil en la predicción, el parámetro más predecible y la combinación binaria con efectos tóxicos que mejor se ajustaran a las estimas obtenidas.

Como se observa en la tabla 22, en nuestras condiciones experimentales, el modelo que mejor se ajusta a la realidad observada es el análisis de pendientes de Sühnel, que acertó en un 90.5 % de sus predicciones. Le sigue el análisis de aditividad de correlación negativa completa modificado que se suele emplear en estudios de genotoxicidad (60.0 %), el isoblograma con un 33.3 % de aciertos y el Principio de Aditividad de Loewe (19.1 %). El resto de modelos tienen tasas de acierto inferiores al 20 %, resultando las correlaciones positivas completas las menos eficaces.

	n	Frecuencia de casos (%)		
		Sinergia	Interacción cero	Antagonismo
<b>Pendientes</b>	21	0.0	90.5	9.5
<b>CNC Modificada</b>	5	0.0	60.0	40.0
<b>Isóbolo</b>	21	23.8	33.3	42.9
<b>CNC</b>	38	52.6	15.8	31.6
<b>PA Loewe</b>	21	23.8	19.1	57.1
<b>SC</b>	33	63.6	15.2	21.2
<b>C.P.C (PPB)</b>	38	68.4	7.9	23.7
<b>C.P.C (BHA)</b>	38	86.8	5.3	7.9

Tabla 22. Comparación de la eficacia de los modelos predictivos analizados, en función de la frecuencia de aciertos (interacción cero) obtenidos. Se detalla el número de casos estudiados (n) con cada modelo. (C.N.C Modificado: Correlación Negativa Completa Modificado; C.N.C: Correlación Negativa Completa; PA Loewe: Principio de Aditividad de Loewe; S.C: Sin Correlación; C.P.C: Correlación Positiva Completa).

La reducción del MTT resultó ser el parámetro más fácilmente estimable, presentando un porcentaje de aciertos en la estima del 32.7 %, mientras que el contenido de proteína celular total y la captura de rojo neutro presentaron un 26.5 y un 20.4 % de predicciones correctas respectivamente. Aunque otros parámetros, como el incremento del porcentaje de células en G0-G1 y el índice de roturas de doble cadena de ADN, tuvieron porcentajes de acierto superiores (37.5 %), hay que tener en cuenta que se trata de parámetros sólo estudiados en dos combinaciones binarias (*Mix 100* y *Mix 300*) y con cuatro modelos de estima lo que produce un n=8. En cambio, de los ensayos colorimétricos se tienen datos de las siete combinaciones binarias con siete modelos de estima diferentes, lo que da un valor de n=49.

Tomando todos los datos en su conjunto y tras el análisis completo de los resultados obtenidos, podemos afirmar que los porcentajes de acierto (interacción cero) en cada combinación binaria obtenidos al estimar el efecto esperado empleando diferentes modelos matemáticos resultó siempre menor al 45 %. Se observaron respuestas contradictorias para una misma mezcla (tabla 23), ya que únicamente algunas predicciones de combinaciones binarias se mostraron de acuerdo como es el caso de BHA 100  $\mu$ M + PPB 200  $\mu$ M y BHA 300  $\mu$ M + PPB 500 $\mu$ M, indicando sinergia en más de 2/3 de los casos analizados.

Nuestros estudios de diferentes parámetros y distintos modelos matemáticos nos permiten definir a *Mix 300* como una combinación con efectos sinérgicos en un 66.6 % de los 48 casos estudiados, resultando en un 18.8 % menores al efecto esperado y sólo predecibles en un 14.6 %.

Por otro lado, en los estudios con *Mix 100*, pudimos observar que un 47.2 % de los casos (n=53) indicaron que era una mezcla sinérgica, en un 28.3 % de los análisis era predecible y sólo en un 24.5 % presentaba una respuesta antagónica.

La mezcla menos tóxica de todas las evaluadas (BHA 100  $\mu$ M + PPB 50  $\mu$ M) resultó ser ambigua en cuanto a su efecto combinado, ya que un 38.1 % de los casos resultaba ser sinérgica, un 33.3 % de las veces se trataba de efecto predecible y en un 28.6 % de los puntos estudiados mostraba efectos antagónicos.

BHA + PPB ( $\mu\text{M}$ )	n	Frecuencia de casos (%)		
		Sinergia	Interacción cero	Antagonismo
<b>100+50</b>	21	38.1	33.3	28.6
<b>100+200</b>	21	76.2	23.8	0.0
<b>100+400</b>	21	47.6	42.9	9.5
<b>100+500</b>	53	47.2	28.3	24.5
<b>1+500</b>	21	23.8	9.5	61.9
<b>10+500</b>	21	23.8	19.1	52.4
<b>300+500</b>	48	66.6	14.6	18.8

Tabla 23. Determinación de la mezcla con la respuesta tóxica más predecible según la frecuencia de aciertos (interacción cero). Se detalla el número de casos estudiados (n).

En cualquier caso y tras analizar los efectos producidos por diferentes mezclas sobre 10 parámetros distintos, con 8 modelos de estima diferentes, se infiere que en la predicción de los efectos tóxicos combinados de mezclas binarias de BHA y PPB no existe ningún método infalible ni hay un parámetro que se ajuste mejor a las estimas realizadas y tampoco hemos encontrado un tratamiento que muestre una respuesta unánimemente predecible.





## Discusión





La fisiología celular está controlada mediante un complejo entramado de señales que comunican unos compartimentos con otros, con el fin de mantener su normal funcionamiento. Las alteraciones del medio interno, debidas a variaciones en el exterior celular, desencadenan respuestas de autorregulación que permiten mantener las condiciones intracelulares constantes. El conjunto de fenómenos de detección, respuesta y adaptación se denomina homeostasis celular. Las células presentan complejos sistemas de control para mantener las condiciones fisiológicas adecuadas, por lo que los cambios en su homeostasis no significan necesariamente la muerte celular. De hecho, la alteración de la homeostasis celular lleva en una primera etapa a un proceso de adaptación, en el que las células mantienen su viabilidad pero modulan su función en respuesta al estímulo. Cuando se exceden los límites de la respuesta adaptativa, las células pasan a una siguiente etapa en la que se producen una serie de acontecimientos que alteran de forma transitoria o permanente, la estructura o la función celular. En este momento, consideramos que se ha producido una lesión celular que implica alteraciones metabólicas con traducción morfológica. La respuesta celular frente a estímulos nocivos depende del tipo de lesión, de su duración y de su gravedad. El límite de tolerancia al daño y la capacidad de volver a niveles normales, tras la retirada del estímulo, determinarán el “punto de no retorno” que conduce a la muerte celular.

Es importante indicar que los efectos tóxicos inducidos por un compuesto químico suelen producirse como consecuencia del daño a diferentes dianas celulares. Por lo tanto, la evaluación toxicológica debe estar basada en distintos parámetros que permitan analizar la fisiología celular en su conjunto. En este sentido, las líneas celulares de mamífero representan un modelo *in vitro* muy eficaz para el análisis de múltiples indicadores de actividad metabólica, viabilidad e integridad morfológica celular y subcelular capaces de determinar la citotoxicidad basal de un compuesto (Fernández Freire y col., 2009).

La evaluación del peligro que supone para la salud la presencia de mezclas químicas ambientales, es un problema toxicológico difícil de solventar y un tema de gran preocupación para las comunidades científicas y reguladoras. Los efectos tóxicos que producen las mezclas de productos químicos son muy complejos y la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha, tienen un carácter meramente descriptivo. Por otra parte, no existe un consenso a la hora de aplicar modelos matemáticos de estima que permitan la predicción de efectos tóxicos de manera fiable. Resulta por tanto evidente la necesidad de desarrollar estrategias de ensayo que permitan la elaboración de perfiles toxicológicos completos de mezclas de compuestos químicos de interés social.

En esta línea, el presente trabajo se marcó como objetivo principal el emplear un protocolo experimental *in vitro* para analizar la posible toxicidad de una mezcla constituida por tert-butil-4-hidroxianisol (BHA) y propil p-hidroxibenzoato (PPB), dos aditivos empleados en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, cuyos efectos contradictorios sobre células y organismos son objeto de continua discusión. La hipótesis de partida del estudio consistió en comprobar si una estrategia de ensayo basada en un modelo celular, que hemos utilizado previamente con buenos resultados para determinar de manera individual el mecanismo de acción de diferentes agentes químicos (Fernández Freire y col., 2005, 2008, 2009; Labrador y col., 2007; Pérez Martín y col., 2008), era capaz de predecir efectos tóxicos relevantes en una mezcla binaria. La estrategia de ensayo incluye el análisis integrado de múltiples parámetros que evalúan la fisiología celular, así como la aplicación de distintos modelos matemáticos de estima sobre los mismos datos, con el fin de evitar resultados imprecisos.

La primera fase de nuestra investigación consistió en recopilar toda la información existente sobre los compuestos en cuestión, tanto características físico-químicas como pruebas toxicológicas ya realizadas, especialmente de forma combinada. Es importante señalar que no existen antecedentes acerca de la posible toxicidad de mezclas binarias BHA-PPB y por lo tanto, carecemos de datos con los que comparar directamente los nuestros. Sin embargo, se ha demostrado que ambos compuestos poseen una gran capacidad de interacción con otros agentes de diversos grupos químicos. Así por ejemplo, el BHA es capaz de incrementar *in vitro* la toxicidad de antioxidantes del té verde (Simonetti y col., 2004), tetrahidrocanabinol (Sarafian y col., 2002) y tioconazol (Simonetti y col., 2003), entre otros. Debido a su capacidad antioxidante, también se han descrito las propiedades anticarcinógenicas de este compuesto en diferentes modelos animales (Williams y Iatropoulos, 1996; Williams y col., 1999). Del mismo modo, existen estudios que han demostrado la promoción de tumores por parte del BHA, tras ser inducidos por otros agentes, aunque en estos casos el protocolo experimental llevado a cabo requiere un pretratamiento y nunca se produce en coexposición (Verhagen y col., 1991; Whysner y Williams, 1996). En el caso del PPB, dada la coexistencia de varios parabenos en múltiples preparados químicos (Soni y col., 2001, 2005; CIREP, 2008; Cowan-Ellsberry y Robison, 2009) la mayoría de las evaluaciones toxicológicas han sido llevadas a cabo en combinación con otros ésteres del ácido p-hidroxibenzoico, con los que muestra efectos aditivos o sinérgicos (Sado, 1973; Elder, 1984; Gilliland y col., 1992a, b; Jian y Li Wan Po, 1993).

En una segunda etapa, se realizó el análisis toxicológico de ambos compuestos de manera individual, con el fin de seleccionar las concentraciones idóneas para la mezcla. Teniendo en cuenta el abordaje mecanístico del estudio y con el fin de facilitar la elección de los modelos de estima, se evaluaron las respuestas tóxicas de las mezclas binarias de BHA y PPB a diferentes dosis.

La viabilidad celular, un factor decisivo a la hora de analizar los efectos tóxicos inducidos por los productos químicos, fue el primero de los parámetros evaluados. Los ensayos realizados muestran valores de efecto muy similares en todos los tratamientos, al normalizar respecto a los valores control. Las tendencias de las curvas dosis-respuesta en la exposición combinada para la incorporación de rojo neutro y la reducción del MTT son prácticamente indistinguibles, igual que ocurre en los tratamientos individuales.

La cuantificación del contenido de proteína celular total, un indicador asociado a la cantidad de células en el cultivo, mostró la misma tendencia que la obtenida con los ensayos de viabilidad. Por lo tanto, los ensayos de citotoxicidad basal revelaban respuestas relacionadas con la cantidad de células que aparecían ancladas al sustrato en cada pocillo, lo que se demostró estadísticamente mediante estudios de correlación. El estudio de las tasas de división celular, mediante recuentos de índice mitótico, confirmó que existía un descenso del número de células en división que explicaba la reducción de la cantidad de proteína en los cultivos. Además la tasa de división resultó ser el ensayo más sensible de los realizados, del mismo modo que ocurre en los tratamientos con ambos compuestos de manera individual. Por otro lado, nuestros resultados indicaron que la exposición a *Mix 300* indujo pérdida de adhesión de la totalidad del cultivo celular, lo que explica los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad basal. Los estudios de citometría de flujo confirmaron el efecto antiproliferativo, al demostrar que los tratamientos con BHA 100  $\mu$ M inducen un incremento del periodo G0-G1, aunque sólo se detectaron cambios estadísticamente significativos en la reducción de la fase G2-M, mientras que la combinación binaria *Mix 100* y la exposición individual a BHA 300  $\mu$ M y PPB 500  $\mu$ M detuvieron el ciclo celular en el periodo G0-G1 de interfase.

Estos resultados coinciden en parte con los de otros autores que han descrito la actividad citostática del BHA y del PPB en diferentes líneas celulares (Krauze y Fitak, 1971; Sheu y col., 1975; Labrador y col., 2007), aunque nunca antes se había precisado la etapa en la que se produce el bloqueo de la proliferación. Por otra parte, la exposición a la combinación binaria *Mix 300* provocó una reducción del número de células en G0-G1 y un incremento en S, sin que se observaran cambios respecto al control en el periodo G2-M. Además, los cultivos expuestos a ambas mezclas mostraron incrementos significativos de los porcentajes de células con cargas superiores a 4c.

De manera general, las predicciones hechas en base a nuestros resultados de toxicidad individual no se han ajustado con precisión a los efectos observados en los estudios de mezclas. En cambio hay que señalar que algunos modelos matemáticos se ajustan mejor que otros, destacando entre ellos el análisis gráfico de pendientes de Sühnel. También los porcentajes de acierto dependen de los parámetros empleados, siendo las respuestas obtenidas con el ensayo de reducción del MTT las más predecibles, a diferencia de lo que ocurre con el ensayo de captura de rojo neutro, un test de relevancia en la metodología de las 3erres validado por la ECVAM en (1997) y recomendado por la Unión Europea (EC, 2000). Por otro lado, los resultados obtenidos en el estudio de contenido de ADN mediante citometría flujo demostraron que los efectos se pueden prever en algunas ocasiones. Tal es el caso de los tratamientos con *Mix 100* para el incremento del porcentaje de células en G0-G1, donde todos los modelos coincidieron en la predicción y acertaron. En cambio, hay que mencionar que existen parámetros para los que no se pudo estimar la respuesta con precisión, como es el caso del incremento de células poliploides en los cultivos expuestos las combinaciones binarias. Este tipo de efectos detectados son alteraciones imprevisibles que los modelos matemáticos no pueden pronosticar, ya que los tratamientos individuales no los muestran ni siquiera de manera incipiente. A este tipo de respuestas, las hemos denominado *efectos emergentes*.

Siguiendo las directrices de las Agencias Internacionales (ICCVAM, 2003) y con el fin de obtener un análisis completo de la citotoxicidad basal de las mezclas objeto de nuestro estudio, los ensayos bioquímicos se complementaron con pruebas morfológicas. Se analizaron mediante microscopía óptica, la morfología celular general así como distintas dianas intracelulares de relevancia mecánica que incluyen el retículo mitocondrial, el compartimento endosomal, el citoesqueleto y el núcleo. Teniendo en cuenta que en este caso se obtienen datos cualitativos, el análisis de los resultados se llevó a cabo empleando un método de estima al que hemos denominado *asociación de efectos*, que consistió en la comparación de las dosis de la combinación con las de los tratamientos individuales en las que se produce la misma alteración. Con este procedimiento podemos definir el tipo de efecto combinado (antagonismo, interacción cero y/o sinergia), y los efectos emergentes observados.

La observación *in vivo* de las células Vero expuestas durante 24 horas a las mezclas *Mix 100* y *Mix 300* puso de manifiesto una evidente degeneración hidrópica que también se observaba después de los tratamientos individuales con 300  $\mu$ M de BHA, pero en ningún caso con PPB. Es importante señalar que otros autores habían observado el mismo fenómeno tanto *in vivo* (Jeong y col., 2005), como *in vitro* (Okubo y col., 2004), aunque no explican su etiología. Las mitocondrias y los lisosomas, después de los tratamientos con las mezclas, revelaron cambios más importantes que los provocados por los compuestos de manera individual. En el caso de las mitocondrias, se observó que todos los tratamientos individuales, con excepción del llevado a cabo con 500  $\mu$ M de PPB durante 4h, indujeron fragmentación del retículo mitocondrial, lo que también se observó en los

tratamientos combinados evaluados (*Mix 100* 24h y *Mix 300* 4h). Estas alteraciones se pueden dar en respuesta a situaciones de estrés relacionadas con patologías celulares como alteraciones en la fosforilación oxidativa (Skulachev, 2001; Ishihara y col., 2003) y cambios en el potencial de la membrana mitocondrial interna (Diaz y col., 2001). Además tras 4 horas de exposición a *Mix 300* se detectó un aparente descenso del potencial de membrana mitocondrial, que sugiere que este orgánulo en estas condiciones se encuentra muy deteriorado.

Por otro lado, se observó una alcalinización del compartimento endosomal en todos los tratamientos de 24 horas. Es de destacar que tras 4 horas de exposición a la combinación binaria *Mix 300*, se detectó el mayor efecto tóxico sobre los lisosomas, presentando una ligera tumefacción y una severa alcalinización que apenas permitía distinguirlos del marcaje del citosol. Únicamente el tratamiento individual con 300  $\mu$ M de BHA mostró alteraciones relevantes sobre este orgánulo, consistentes en una leve tumefacción en este mismo tiempo de exposición.

En cuanto a las observaciones de la integridad del citoesqueleto después de los tratamientos combinados e individuales hay que señalar que ninguno indujo alteraciones en la organización de los microtúbulos interfásicos. Sin embargo, tras 4 horas de exposición a *Mix 300* observamos un incremento de células con husos mitóticos mal organizados, debido a que los centrosomas se situaban muy próximos entre sí. Por otro lado, *Mix 100* 24 h y *Mix 300* 4 h mostraron alteraciones sobre los microfilamentos de actina que consistían fundamentalmente en la desorganización de las fibras de estrés. Además de esta remodelación del citoesqueleto, un elevado número de células presentaron un cambio morfológico general apareciendo con aspecto dendrítico. Esta alteración afectó a todo el cultivo que se mantenía anclado al sustrato tras el tratamiento con *Mix 300* a las 9 horas de exposición. La asociación temporal entre el incremento de células en la fracción flotante y la reorganización del citoesqueleto podría indicar que esta alteración es la responsable de la pérdida de adhesión que sufre el cultivo, ya que la correcta unión al sustrato depende en gran medida de la precisa estructuración del citoesqueleto de actina. Por otro lado, en los tratamientos individuales (BHA 100  $\mu$ M 24 horas, 300  $\mu$ M 4 horas y PPB 500  $\mu$ M 4 y 24 horas) no se observaron alteraciones sobre los microfilamentos y las células que se recogieron en la fracción flotante se encontraban muertas.

La morfología nuclear fue el último de los parámetros evaluados en los ensayos de citotoxicidad basal. La exposición a las mezclas binarias BHA-PPB dio lugar a la aparición de diferentes tipologías, que indicaban cambios en el material genético, relacionados en su mayoría con procesos de muerte celular. Teniendo en cuenta la dificultad para discriminar los distintos tipos de muerte celular basándose exclusivamente en criterios morfológicos, la clasificación se hizo de acuerdo a las recientes recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Muerte Celular (Kroemer y col., 2009). Las células tratadas con *Mix 100* durante 24 horas presentaban una fragmentación característica de la cromatina, compatible con muerte de tipo apoptótico, que también se observaba en los tratamientos individuales con BHA 300  $\mu$ M y PPB 500  $\mu$ M. Sin embargo, la fracción de células flotantes resultante del tratamiento durante 24 horas con *Mix 300*, mostraba tanto figuras apoptóticas clásicas, como núcleos con un único bloque de cromatina muy picnótica con fragmentos dispersos, característicos de los procesos de necrosis secundaria. Un tercer tipo de morfologías estaba representado por núcleos interfásicos de aspecto anómalo, que no eran compatibles con procesos de muerte celular según los criterios de clasificación utilizados. Tras la tinción de las células con Hoechst 33258, se observaban núcleos con un alto grado de condensación de la cromatina de distribución heterogénea y otros que presentaban regiones especialmente picnóticas. En el caso de los tratamientos de 4 horas, los cultivos

expuestos a *Mix 300* también mostraron células con husos mitóticos mal estructurados, llegando a ser la mitad de las células en metafase cuantificadas. Este valor se incrementó hasta casi el 90 % en los tratamientos a 9 horas. Un estudio detallado de las placas metafásicas con husos anómalos, descritos anteriormente, demostró que los cromosomas de las células tratadas presentaban un tamaño mucho menor que el observado en los cultivos control.

Tomando en conjunto todos los resultados morfológicos obtenidos y aplicando sobre ellos el método de asociación de efectos, hemos podido determinar que de manera general se observan efectos combinados de tipo sinérgico. Las respuestas obtenidas tras la exposición continua a *Mix 300* fueron mucho más evidentes que las observadas en los tratamientos individuales. Por ejemplo, las alteraciones del retículo mitocondrial en las células tratadas durante 4 horas con la combinación binaria *Mix 300*, provocaron efectos mucho más intensos que los detectados de manera individual en el mismo tiempo de exposición. Lo mismo ocurrió para la degeneración hidrópica, los efectos observados sobre el compartimento endosomal, la remodelación del citoesqueleto de actina y la morfología nuclear. Mención especial merece este último caso, donde se analizaron los cultivos a 4 y 24 horas, detectándose efectos emergentes surgidos de la exposición combinada, como el bloqueo en metafase, el acortamiento de los cromosomas y las morfologías nucleares interfásicas de aspecto heterogéneo. Además, también hemos podido relacionar alteraciones inducidas tras la exposición durante 4 horas a *Mix 300* con las descritas en células sometidas a tratamientos individuales con BHA en dosis y/o tiempo muy superiores a los ensayados en esta mezcla. Por ejemplo los tratamientos individuales con 300  $\mu$ M de BHA durante 24 horas indujeron degeneración hidrópica y alteraciones sobre la integridad del retículo mitocondrial de similar intensidad.

Del mismo modo, las alteraciones descritas en el retículo mitocondrial y en el compartimento endosomal tras 24 horas de tratamiento con *Mix 100* resultaron mayores que las detectadas en las exposiciones individuales, lo que también ocurrió en el caso de otros parámetros morfológicos analizados, como la degeneración hidrópica y el citoesqueleto de actina. En ambos parámetros no se produjeron alteraciones tras los tratamientos por separado, pero sí con la combinación binaria, permitiéndonos definirlo como efecto emergente.

En cuanto a los parámetros cuantitativos (pérdida de adhesión celular y frecuencia de células muertas en base a la morfología nuclear), los resultados obtenidos para las mezclas *Mix 100* y *Mix 300* indicaron respuestas sinérgicas en todos los tiempos de exposición.

La valoración general de los resultados de citotoxicidad basal confirmó la importancia de utilizar parámetros morfológicos como complemento de las pruebas cuantitativas, cuando se lleva a cabo un estudio *in vitro*. La microscopía óptica nos permitió identificar en las células Vero efectos citotóxicos tales como el desequilibrio osmótico, las alteraciones del citoesqueleto de actina y la pérdida de integridad nuclear, que no se ponen de manifiesto con los ensayos bioquímicos habituales. Sin embargo, para conseguir una visión global de la respuesta celular que produce un tratamiento experimental, es necesario integrar todos los datos antes de proponer un posible mecanismo de acción tóxica. En este sentido, es importante señalar que una lesión celular puede ser consecuencia del desajuste de distintos procesos moleculares que se encuentran interrelacionados e integrados en complejas rutas de señalización. Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo consistió en establecer las posibles relaciones causa-efecto entre los diferentes indicadores de citotoxicidad evaluados, así como estimar la relevancia de los datos obtenidos. Como cabía

esperar, esta fase del estudio demandó pruebas complementarias a las previamente realizadas, que se fueron llevando a cabo de acuerdo a las necesidades particulares de cada resultado.

La respuesta tóxica principal, inducida por las mezclas de BHA y PPB en las células Vero, consistió en una parada de proliferación. Las células frente a diferentes situaciones de estrés detienen su ciclo celular, en la fase G1 o en la transición G2-M, con el fin de conseguir un tiempo adicional para reparar daños y evitar posibles lesiones. En este sentido, la degeneración hidrópica, asociada a la parada de ciclo en los cultivos expuestos a *Mix 100* y *Mix 300*, podría considerarse como un primer intento por preservar la estructura y función de los componentes celulares ante la entrada masiva de agua. Sin embargo, la vacuolización citosólica era concomitante con la tumefacción de orgánulos y la desorganización del citoesqueleto de actina, lo que parece indicar que las células Vero se encontraban en una situación sostenida de estrés hiposmótico.

El flujo incontrolado de agua hacia el interior celular activa un mecanismo denominado “disminución regulada de volumen” (DRV) mediante el cual las células recuperan su estado inicial sin comprometer su supervivencia (Schliess y col., 2007). No hay que olvidar que el volumen celular controla un gran número de actividades fisiológicas entre las que destacan la proliferación, la diferenciación, la migración, el metabolismo y la muerte celular (Wehner y col., 2003). El proceso que rige el restablecimiento del volumen celular es extremadamente complejo a nivel molecular y requiere la participación de elementos sensores, vías de transducción de señales y efectores, característicos de cada tipo celular (Jakab y col., 2002; Pasantes-Morales y col., 2006; Hoffmann y col., 2009). De forma muy general, el mecanismo consiste en incrementar la permeabilidad de la membrana plasmática a determinados osmolitos, activando sistemas de transporte que reducen temporalmente la osmolaridad intracelular y facilitan la salida de agua. En la mayoría de las células animales se produce una primera respuesta adaptativa, que suele durar unos minutos, en la que la célula libera  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  a través de canales y sistemas de cotransporte presentes en su membrana. En una segunda etapa más lenta, se liberan al exterior celular determinados osmolitos orgánicos como aminoácidos, polialcoholes y metilaminas.

Los efectos citotóxicos observados en las células Vero tratadas con *Mix 100* y *Mix 300* indican que el mecanismo regulador DRV no actuó de forma eficaz. La identificación de fallos en un proceso de regulación osmótica es una tarea bastante dificultosa debido a que los mecanismos moleculares implicados están interrelacionados y son propios de cada tipo celular. Sin embargo, los eventos claves en las células Vero han sido previamente detallados por otros autores, lo que nos ha permitido deducir de forma indirecta posibles interferencias producidas por nuestro tratamiento experimental.

La respuesta de estrés hipotónico en la línea celular Vero depende en gran medida de la activación de canales de  $\text{K}^+$  de alta conductancia caracterizados como tipo BK (Hafting y Sand, 2000). Estos canales iónicos, denominados también *Slo* o *MaxiK*, constan de 4 subunidades  $\alpha$  con siete dominios transmembranosos (S0-S6) y 1-4 subunidades  $\beta$  reguladoras. Los dominios transmembranosos S1-S4 actúan como sensores de voltaje y los S5-S6 forman el poro de conducción de  $\text{K}^+$ . El canal presenta un gran dominio citosólico C-terminal que contiene una región de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , dos regiones de regulación de la conductancia (RCK), un dominio de tetramerización, dos lugares de fosforilación, un dominio de unión a la caveolina y motivos leucina/isoleucina (LZ) esenciales para la interacción proteína-proteína. Por su parte, el dominio extracelular N-terminal (S0) es el lugar de unión para la

subunidad  $\beta$  auxiliar (Orio y col., 2002; Wang y Sigworth, 2009). En el riñón, los canales BK se encuentran distribuidos a lo largo de los diferentes segmentos de la nefrona, participando en la secreción renal y actuando como efectores del mecanismo regulador del volumen celular (Hebert y col., 2005; Pluznick y Sansom, 2006; Wagner, 2010). A pesar de que presentan una considerable diversidad funcional, debido a las isoformas producidas por “*splicing*” alternativo del ARNm (Tian y col., 2001; Fodor y Aldrich, 2009), todos los canales BK se activan por despolarización de la membrana y por incrementos en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Horrigan y Aldrich, 2002; Cui y col., 2009). El aumento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico es un cambio inicial que se observa en células de distinto origen tisular sometidas a estrés hiposmótico, si bien las consecuencias parecen ser características de cada tipo celular (Pasantes-Morales y Mulia, 2000; Okada y col., 2001; Lang y col., 2007). En el caso de la línea celular Vero, se ha demostrado que provoca la apertura de canales BK y la consiguiente liberación de  $\text{K}^+$ , en un proceso mediado por la activación de receptores purinérgicos  $\text{P2Y}_1$  (Hafting y col., 2006). Los receptores metabotrópicos de la familia  $\text{P2Y}_1$  están acoplados a proteínas Gq en la membrana celular, por lo que su activación estimula la vía fosfolipasa C  $\beta$  (PLC  $\beta$ ) que utiliza inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) y diacilglicerol (DAG) como segundos mensajeros, para movilizar  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares y activar la proteinkinasa C (PKC).

La conductancia de  $\text{Cl}^-$  en respuesta al estrés hipotónico está poco caracterizada a nivel molecular, a pesar de los esfuerzos para determinar los canales responsables en multitud de tipos celulares. Actualmente se piensa que el  $\text{Cl}^-$  se libera a través de transportadores poco selectivos que permiten también la salida de osmolitos orgánicos (Nilius y Droogmans, 2003; Sardini y col., 2003; Wehner y col., 2003). Hasta la fecha no se ha propuesto ningún candidato en las células Vero, aunque es posible que los sistemas de antiporte  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  que utilizan para el control del pH interno (Olsnes y col., 1987) estén involucrados, como ocurre en otras células de origen renal (Warth y col., 2004; L’Hoste y col., 2007).

Diversas alteraciones celulares observadas en nuestras condiciones experimentales, tales como cambios en la fisiología de la membrana, desorganización del citoesqueleto de actina e incrementos en los niveles intracelulares de ERO, han sido descritos como factores capaces de modular el mecanismo de regulación osmótica (Hoffmann y Pedersen, 2006; Pasantes-Morales y col., 2006; Lang y col., 2007). La membrana plasmática es la primera estructura celular con la que se enfrenta un agente químico incorporado a un medio de cultivo. Tanto el BHA como el PPB son compuestos lipofílicos que desestabilizan las membranas celulares por intercalación en la bicapa lipídica (Stubbs y Smith, 1984; Panicker, 2008). Existen además evidencias de que la interacción de ambos compuestos con las bicapas lipídicas no sólo altera la permeabilidad y estructuración de las mismas sino que interfiere con la actividad de determinados canales iónicos. Así por ejemplo, el PPB provoca la apertura de canales de  $\text{K}^+$  (Bredin y col., 2005; Nguyen y col., 2005; Kamaraju y Sukharev, 2008), mientras que el BHA inhibe la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior celular pero no afecta a la actividad de los canales responsables de la liberación de  $\text{K}^+$  (Fusi y col., 2000, 2001).

Nuestras observaciones microscópicas demuestran que los componentes de las mezclas binarias actuaron en sinergia, produciendo alteraciones en la membrana plasmática de las células Vero que facilitan la entrada masiva de agua. Sin embargo, es de destacar que no se produjeron signos de degeneración hidrópica durante los tratamientos individuales con PPB 500  $\mu\text{M}$ , lo que podría atribuirse a un incremento en la activación de los canales  $\text{K}^+$ . De la misma manera, sería razonable pensar que la aparente ineficacia del mecanismo regulador del volumen en las células Vero

tratadas con BHA 300  $\mu$ M, *Mix 100* y *Mix 300* pudiera deberse a una inhibición de los canales BK. En dichas condiciones experimentales, observamos una relación directa entre los fenómenos de degeneración hidrónica y la desestructuración de las fibras de estrés. La pérdida de integridad y patrón de distribución de los microfilamentos es una respuesta celular muy común en los procesos de estrés osmótico, cuyo significado funcional no está completamente definido (Pedersen y col., 2001; Hoffmann y col., 2009). La regulación de los canales BK depende de la interacción del dominio citosólico C-terminal con el citoesqueleto de actina, a través de la proteína adaptadora cortactina (Tian y col., 2008). Sin embargo, la despolimerización de la actina F tiene efectos opuestos sobre la actividad de dichos canales ya que se ha descrito tanto activación (Kraft y col., 2000; O'Malley y col., 2005) como inhibición (Jovanovic y Jovanovic, 2001; Huang y col., 2002), dependiendo de las condiciones experimentales y del tipo celular analizado. Existe además la idea de que los microfilamentos de actina controlan el funcionamiento de los canales de K<sup>+</sup> en condiciones normales, pero podrían no estar implicados en el incremento de la conductancia de este ion durante el estrés hipotónico (Lai y col., 2004).

Por otra parte, las mezclas *Mix 100* y *Mix 300* así como los tratamientos individuales con BHA 300  $\mu$ M y PPB 500  $\mu$ M incrementaron los niveles basales de ERO en nuestro sistema experimental. Aunque este resultado pudiera resultar llamativo, dado que los compuestos analizados se utilizan como antioxidantes, diversos estudios indican que las moléculas con capacidad antioxidante son capaces de actuar como pro-oxidantes en función de la dosis empleada (Fukumoto y Mazza, 2000; Halliwell y Whiteman, 2004; Valko y col., 2007). De hecho, nuestros datos procedentes del ensayo de DCFH-DA en las células Vero indican que la concentración de BHA 100  $\mu$ M reduce los niveles intracelulares de ERO, a diferencia de lo que ocurre después de los tratamientos con 300  $\mu$ M.

La concomitancia entre el estrés hipotónico y la generación de ERO ha sido descrita en diferentes tipos celulares (Schliess y col., 2007; Rojas-Rivera y col., 2009), incluyendo los de origen de renal (L'Hoste y col., 2007, 2009). La principal fuente de especies reactivas de oxígeno en la célula son las mitocondrias, a través de los distintos complejos de la cadena de transporte electrónico situada en la membrana interna (Andreyev y col., 2005; Murphy, 2009). Las ERO modifican el estado redox de moléculas tales como proteinkinases, proteínofosfatasas y factores de transcripción (Droge, 2002; Poli y col., 2004; Mates y col., 2008) y por lo tanto tienen un papel fundamental en numerosas rutas de señalización, incluyendo la osmotransducción (Lambert, 2003; Varela y col., 2004; Stutzin y Hoffmann, 2006). En las células eucariotas, la inhibición de los complejos I (NADH deshidrogenasa), II (succinato deshidrogenasa) y III (ubiquinona-citocromo c oxidorreductasa), incrementa la cantidad de ERO que se generan constitutivamente fruto de la actividad de la cadena respiratoria (Turrens, 2003). Esto explicaría nuestros resultados ya que el BHA es capaz de alterar el funcionamiento de los complejos I, II, III y IV comprometiendo el flujo de electrónico (Okubo y col., 2004), además de generar desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Fusi y col., 1992). Asimismo, se ha demostrado que el PPB interfiere con los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial y actúa como agente desacoplante (Nakagawa y Moldéus, 1998; Tavares y col., 2009).

La importancia del potencial redox intracelular en la conductancia de los canales BK ha sido objeto de numerosas investigaciones durante los últimos años, debido a sus implicaciones patofisiológicas. Las características biofísicas de estos canales comportan diferentes dianas susceptibles de oxidación, tanto en las subunidades  $\alpha$  como en las  $\beta$  (Tang y col., 2001; Erxleben y col., 2002; Zeng y col.,



2003). Diferentes estudios han demostrado que el anión superóxido ( $O_2^-$ ) no tiene efecto sobre los canales BK (Liu y col., 2002; Tang y col., 2004), mientras que el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) presenta efectos contradictorios (Lu y col., 2006). El  $H_2O_2$  puede activar estos canales de  $K^+$  directamente (Bychkov y col., 1999) o a través de rutas de señalización dependientes de GMPc y AMPc (Thengchaisri y Kuo, 2003; Shimokawa y Matoba, 2004), cuando se aplica desde el medio extracelular. Sin embargo, la presencia de esta especie reactiva de oxígeno en el interior de las células inhibe la actividad de los canales BK, mediante la modificación oxidativa del residuo de cisteína C911 (Soto y col., 2002; Tang y col., 2004; Lu y col., 2006) ó C430 (Zhang y Horrigan, 2005), localizados en el extremo C-terminal de la subunidad  $\alpha$ .

La presencia intracelular de ERO fue demostrada en nuestras condiciones experimentales utilizando dos marcadores de estrés oxidativo, la cuantificación de la fluorescencia de diclorofluoresceína (DCF) y la inmunodetección de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG).

El compuesto fluorogénico DCFH-DA fue descrito inicialmente como un método de medida de  $H_2O_2$  (Keston y Brandt, 1965), si bien la controversia existente acerca de los radicales capaces de oxidar esta molécula hace que se considere actualmente como un indicador general del estado oxidativo de las células (Halliwell y Whiteman, 2004). Por su parte, la 8-OHdG, que deriva de la adición de un radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ) a la guanina en la posición C8 (Cadet y col., 1999), es un marcador sensible y específico de daño oxidativo en el ADN (Valavanidis y col., 2009). Teniendo en cuenta el absoluto paralelismo entre los resultados obtenidos en los ensayos de DCFH-DA y 8-OHdG, cuando se evaluaron los niveles de ERO en células Vero que sufrían estrés hipotónico, podemos considerar que el  $OH^\bullet$  es uno de los radicales generados en nuestras condiciones experimentales. Esta observación es de gran interés, ya que existen evidencias de que la disfunción de los canales BK inducida por  $H_2O_2$  endógeno está mediada por radicales  $OH^\bullet$  (Soto y col., 2002), que se originan a partir de  $H_2O_2$  mediante la reacción de Fenton o de Haber-Weiss. Además, es importante indicar que la modificación oxidativa, responsable de la inhibición de la conductancia de  $K^+$ , es dependiente de la concentración intracelular de  $H_2O_2$  (Soto y col., 2002; Tang y col., 2004). Esto explicaría que las células tratadas con PPB 500  $\mu M$  no sólo estarían protegidas contra el estrés osmótico por la capacidad del compuesto para activar los canales BK, sino porque muestran niveles de ERO significativamente menores que los observados después de los tratamientos con BHA 300  $\mu M$ , *Mix 100* y *Mix 300*.

En base a las situaciones anteriormente descritas, nuestros resultados sugieren que el estrés oxidativo podría jugar un importante papel en el desequilibrio osmótico observado en nuestro sistema experimental. Sin embargo, no hay que olvidar que los canales BK puede ser modulados por otros factores entre los que destacan la fosforilación, el pH y ciertos mensajeros endógenos (Ghatta y col., 2006; Nardi y Olesen, 2008). Por otra parte, la actividad de los canales iónicos debe estar coordinada con otros muchos componentes del mecanismo DRV para que las células respondan correctamente ante una situación de estrés hipotónico. Por lo tanto, para definir con exactitud el/los mecanismos subyacentes al estrés osmótico provocado por las combinaciones binarias de BHA y PPB en las células Vero, serían necesarios estudios adicionales que escapan de los objetivos de la presente tesis.

El estrés oxidativo, causado por el desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad de defensa antioxidante, puede tener importantes consecuencias en los sistemas biológicos (Halliwell, 2008). Las ERO pueden afectar a la fisiología celular debido a su gran reactividad con biomoléculas

esenciales como lípidos, proteínas y ADN (Valko y col., 2006). Las principales consecuencias de este daño oxidativo son cambios en las tasas de proliferación y muerte celular (Temple y col., 2005), que constituyen la base de diferentes patologías humanas entre las que se incluyen diabetes, cáncer, aterosclerosis y ciertas enfermedades neurodegenerativas (Favier, 2006; Giustarini y col., 2009). El daño oxidativo en el ADN, fue evidenciado en las células Vero por la presencia de niveles significativos de 8-OHdG, después de los tratamientos con los compuestos individuales y sus mezclas binarias. En este punto es importante señalar los resultados obtenidos en los cultivos expuestos a BHA 100  $\mu\text{M}$  durante 24 horas, donde en ausencia de estrés oxidativo según los ensayos de diclorofluoresceína o dihidroetidina, se cuantificaron índices de 8-OHdG superiores a los detectados en los respectivos controles. Está bien documentado que los compuestos fenólicos pueden oxidarse en radicales fenoxilo ( $\text{PhO}^\bullet$ ) por la acción de las peroxidasas celulares y reaccionar fácilmente con el C8 de la desoxiguanosina, generando 8-OHdG (Manderville, 2005). Por lo tanto, la lesión oxidativa en el ADN de las células Vero derivada de los tratamientos con BHA podría atribuirse a la formación de dichos radicales, como se ha sugerido previamente en otras líneas celulares (Phillips y col., 1989; Saito y col., 2003). Además, los radicales fenoxilo también se originan a partir de los parabenos (Duesteberg y Waite, 2007) y pueden ser transformados por antioxidantes celulares (GSH, NADH, ascorbato) en  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , que por dismutación produce  $\text{H}_2\text{O}_2$  y eventualmente  $\text{OH}^\bullet$  (Shvedova y col., 2000; Galati y col., 2002). Esto implica que no podemos descartar la posible participación de los radicales  $\text{PhO}^\bullet$  en los efectos tóxicos observados como consecuencia de los tratamientos con BHA 300  $\mu\text{M}$ , PPB 500  $\mu\text{M}$  y sus mezclas binarias.

La inducción de estrés oxidativo, como mecanismo subyacente de la toxicidad inducida por el BHA en las células Vero, concuerda con datos previos de otros autores que muestran la habilidad del compuesto para generar radicales libres (Sato y col., 1999; Fukumoto y Mazza, 2000). Asimismo, los efectos genotóxicos observados en linfocitos humanos *in vitro* (Schilderman y col., 1995), órganos gastrointestinales de ratón (Sasaki y col., 2002) y células CHO (Abe y Sasaki, 1977; Phillips y col., 1989) han sido atribuidos al carácter pro-oxidante del BHA. Por otra parte, algunos estudios han sugerido que los parabenos pueden potenciar el estrés oxidativo en células epiteliales (Handa y col., 2006; Nishizawa y col., 2006) y causar peroxidación lipídica en eritrocitos humanos y homogeneizados de riñón e hígado de ratón (Asnani y Verma, 2006, 2007). Sin embargo, nuestro estudio es el primero en demostrar que el PPB es capaz de inducir daño oxidativo en el material genético. En base a los resultados de los tratamientos individuales con BHA y PPB, es razonable pensar que los efectos causados en las células Vero por la exposición a *Mix 100* (24 horas) y *Mix 300* (4 horas), puedan estar mediados por la presencia de ERO. De hecho, los valores del índice 8-OHdG correspondientes a las mezclas binarias pudieron ser estimados con precisión mediante modelos matemáticos. El polinomio que predijo los daños oxidativos tras la exposición a *Mix 100* se basó en los resultados de ambos tratamientos por separado y del nivel basal de daño, mientras que la ecuación de estima que mejor se ajustó a los resultados de *Mix 300* se fundamentó en la respuesta individual del BHA. Los otros tres modelos empleados no generaron predicciones correctas, indicando sinergia en el caso de *Mix 100* y antagonismo para *Mix 300*.

En este punto, es fundamental destacar que en las mismas condiciones experimentales en las que observamos valores significativos del índice 8-OHdG, detectamos la presencia de focos nucleares de  $\gamma\text{-H2AX}$ , un reconocido marcador de roturas de doble de cadena en el ADN (Kuo y Yang, 2008). Las células eucarióticas presentan diferentes mecanismos de defensa para mantener la integridad del material genético y evitar la tumorigénesis. En el caso de las dobles roturas, la

kinasa ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) actúa como sensor de daño y coordina una ruta de señalización específica mediante la fosforilación de sustratos tales como p53, Chk2, Chk1, Brca1 y H2AX (Shiloh, 2003). La fosforilación de la histona H2AX en la serina 139 ( $\gamma$ -H2AX) constituye uno de los primeros pasos del sistema de reparación de daño al ADN en las células eucarióticas (Rogakou y col., 1998; Burma y col., 2001). Por otra parte, la activación del factor de transcripción p53 resulta esencial para la regulación de genes implicados en la detención del ciclo celular, la reparación de las lesiones y en su defecto, la inducción de apoptosis (Pietenpol y Stewart, 2002; Harris y Levine, 2005; Murray-Zmijewski y col., 2008). Esta respuesta de daño al ADN se activa por diversos factores, entre los que se incluyen la presencia de daño oxidativo durante la progresión del ciclo celular (Tanaka y col., 2006; Kulkarni y Das, 2008) y el estrés hipotónico (Kanu y Behrens, 2007).

La integración de los resultados obtenidos en esta fase del estudio, nos permitió la formulación de una serie inicial de conclusiones. En primer lugar, los radicales libres parecen ser los principales responsables de las dobles roturas de ADN, causadas por los tratamientos con los componentes individuales y sus mezclas. No obstante, conviene contemplar para futuras investigaciones un reciente estudio que demuestra la capacidad del BHA para intercalarse en el ADN *in vitro* (Kashanian y Dolatabadi, 2009), lo que podría favorecer la inducción de lesiones. Por otra parte y como ya se ha indicado, observamos incrementos en los niveles de ploidía de las células Vero, después de los tratamientos de 24 h con ambas mezclas binarias, siendo especialmente significativos en el caso de *Mix 300*. Las células poliploides se originan principalmente por rondas sucesivas de replicación del ADN sin intervención de la mitosis, o bien por la presencia de husos no funcionales que provocan la salida prematura de mitosis (Storchova y Pellman, 2004; Decordier y col., 2008). Es importante recordar que dicha mezcla ocasionó en las células Vero bloqueos de proliferación en la fase S del ciclo, así como husos aberrantes en los que los cromosomas presentaban condensación anómala. Estos eventos, detectados desde tiempos breves de exposición a *Mix 300*, eran concomitantes a incrementos en los niveles intracelulares de ERO y han sido descritos previamente por otros autores, en diversas situaciones de estrés oxidativo (Kurata, 2000; Gorla y col., 2001; Monks y col., 2006). En segundo lugar, encontramos evidencias que nos permiten deducir, de manera indirecta, que la ruta de señalización de daño al ADN se activó adecuadamente en nuestras condiciones experimentales: 1) la relación entre la presencia de focos nucleares de  $\gamma$ -H2AX y la parada del ciclo en la fase G1 y 2) la aparición de un número significativo de núcleos fragmentados y/o condensados caracterizados como apoptóticos, en la fracción flotante de los cultivos. Por último destacar que un considerable desajuste en las tasas de proliferación con resultado final de “catástrofe del ciclo” y en ocasiones inducción de apoptosis, ha sido descrito previamente en diversas líneas celulares de origen humano, sometidas a estrés hipotónico (Tao y col., 2002).

Las estimaciones realizadas con los diferentes modelos matemáticos pudieron predecir algunos de los resultados descritos en el apartado anterior. Así por ejemplo, la frecuencia de células positivas a  $\gamma$ -H2AX, después de 4 horas de tratamiento con *Mix 100*, se pudo calcular empleando un modelo de correlación positiva completa, en base a los datos obtenidos tras la exposición a BHA. Por otro lado, las roturas de doble cadena causadas por la exposición a dicha mezcla durante 24 horas fueron predichas con exactitud mediante el modelo de correlación negativa modificado para parámetros genotóxicos. El resto de ecuaciones empleadas para valorar el efecto combinado de *Mix 100* no se ajustaron con precisión a los resultados observados. En el caso del tratamiento *Mix 300* durante 4 horas, los dos modelos basados en aditividad estimaron correctamente los resultados. Por último, la frecuencia de células muertas en los tratamientos *Mix 100* y *Mix 300* presentó

valores superiores a los esperados, lo que implica que los componentes de las mezclas actuaron en sinergia.

Los resultados descritos hasta el momento proceden de análisis realizados según un protocolo experimental de toxicidad aguda, que implica una exposición continua de 24 horas a los compuestos individuales y sus mezclas. Aunque los efectos citotóxicos de numerosos agentes químicos desaparecen al cesar los tratamientos y consiguientemente se consideran reversibles, es bien conocido que en algunos casos se observan procesos de toxicidad retardada. Por lo tanto, el tiempo transcurrido entre el final del tratamiento y el momento de realizar el ensayo, es un factor esencial a tener en cuenta cuando se evalúa el perfil toxicológico de un compuesto (Komissarova y col., 2005). Esta indicación es también válida en los estudios de riesgo tóxico de mezclas químicas, en los que se recomienda analizar además de la toxicidad aguda, los posibles efectos causados por exposiciones crónicas, secuenciales y retardadas (Rice y col., 2008; Altenburger y Greco, 2009). Teniendo en cuenta estas observaciones, decidimos comprobar la reversibilidad de los daños citotóxicos, así como la posible aparición de efectos secundarios en células Vero incubadas en medio fresco, después de haber sido sometidas a diferentes tratamientos experimentales.

Como se ha detallado previamente, los cultivos expuestos durante 24 horas a *Mix 300* mostraron valores nulos de supervivencia, con un importante número de células flotantes y un mínimo porcentaje con morfología notablemente alterada que permanecían ancladas al sustrato. La incubación durante 24 horas adicionales de las células adheridas en medio fresco en ausencia de drogas, tuvo como resultado la muerte de la totalidad del cultivo. De la misma manera, la fracción flotante no recobró la capacidad de adhesión y tras 24 horas de recuperación no se observaron células vivas. Estos resultados sugieren que el límite de tolerancia de las células Vero había sido superado, probablemente debido a la intensidad y/o duración del tratamiento, produciendo lesiones celulares irreversibles.

Sin embargo, la vacuolización citosólica de las células Vero atribuida al estrés hipotónico resultante de la exposición continua a BHA 300  $\mu\text{M}$  y *Mix 100*, dejó de ser evidente tras incubar los cultivos durante 48 horas en ausencia de los compuestos. La reversibilidad de este efecto tóxico, que habíamos descrito previamente para dosis de BHA menores de 375  $\mu\text{M}$  (Labrador y col., 2007), sugiere que los mecanismos de disminución regulada del volumen celular podrían haberse restablecido. Otro resultado importante a destacar en esta fase del estudio fue la reducción del número de células positivas a  $\gamma\text{-H2AX}$ , 24 horas después de retirados los tratamientos con los compuestos individuales, excepto en el caso de BHA 300  $\mu\text{M}$  en el que el daño al ADN parecía ser irreversible. Los resultados de los cultivos previamente expuestos a *Mix 100* revelaron una disminución significativa del número de células con roturas de doble cadena, a pesar de que los valores duplicaban los obtenidos en los respectivos controles. El mantenimiento de la estabilidad genómica y la supervivencia celular, después de una lesión en el ADN, depende conjuntamente de la adecuada regulación de los sistemas de reparación del daño y de los puntos de control del ciclo (Rich y col., 2000). Las células eucarióticas disponen de dos estrategias principales para subsanar las roturas de dobles cadena de ADN, denominadas recombinación homóloga (HR) y reunión de extremos no homólogos (NHEJ) (Karagiannis y El-Osta, 2004; Cann y Hicks, 2007; Ohnishi y col., 2009). Ambos mecanismos no son mutuamente excluyentes, aunque la contribución relativa de cada uno de ellos parece depender del estadio del ciclo celular en el que se produce el daño (Sonoda y col., 2006; Hartlerode y Scully, 2009). Las células de mamífero utilizan principalmente el mecanismo de reparación NHEJ que puede operar en cualquier fase del ciclo celular, restaurando la integridad del ADN con

escasas modificaciones a nivel de secuencia (Kanaar y col., 2008; Lieber, 2008). Teniendo en cuenta que una vez retirados los tratamientos con BHA 300  $\mu\text{M}$  o *Mix 100*, los cultivos seguían presentado un número significativo de células con dobles roturas de ADN, se puede considerar la posibilidad de que dichos resultados sean consecuencia de fallos en el mecanismo de reparación. De hecho, se ha demostrado en otras líneas celulares de mamífero que la exposición a BHA en el rango 250-500  $\mu\text{M}$  es capaz de inhibir la reunión de extremos de ADN dañado (Slamenová y col., 2003) y que el PPB, en concentraciones cuatro veces superiores a las utilizadas en este estudio, causa daños genotóxicos por fracasos de la reparación (Tayama y col., 2008). A pesar de que el mecanismo molecular responsable de la interferencia de estos compuestos con el sistema de reparación del ADN no está bien establecido, parece ser dependiente de la concentración según indican los estudios anteriormente mencionados. Esta circunstancia coincide con nuestros datos ya que las células sometidas a tratamientos con BHA 100  $\mu\text{M}$  o PPB 500  $\mu\text{M}$  de manera individual, no presentaban dobles roturas de ADN después de 24 h de recuperación.

Del mismo modo, comprobamos que una vez retirados los tratamientos experimentales los cultivos que aparentemente habían reparado las lesiones en el ADN recobraron su capacidad de proliferación, con tasas superiores a las de los respectivos controles. El incremento en la actividad proliferativa, cuando se ha completado la reparación y cesa la activación de la respuesta de daño al ADN, se considera una de las principales respuestas adaptativas a las que recurren las células para alcanzar un nuevo estado de equilibrio y preservar su viabilidad (Kumar y col., 2008). Esta estimulación de la proliferación regenerativa juega un importante papel en el proceso de carcinogénesis química ya que requiere la activación transcripcional de genes relacionados con el control del crecimiento, algunos de los cuales son oncogenes o genes supresores de tumores (Butterworth y col., 1992; Butterworth y Bogdanffy, 1999). Por otra parte y de forma inesperada, los cultivos que mantenían un número significativo de células positivas a  $\gamma\text{-H2AX}$  adoptaron el mismo comportamiento. Existen evidencias de que las células con daños persistentes o irreparables en el ADN, a pesar del bloqueo prolongado en los puntos de control, pueden reanudar su ciclo como un mecanismo de adaptación (Bartek y Lukas, 2007; Clemenson y Marsolier-Kergoat, 2009). Aunque de forma general las células que sufren dicho proceso mueren en los ciclos sucesivos, algunas pueden sobrevivir y seguir proliferando debido a un control defectuoso del ciclo celular (van Vugt y col., 2005; Syljuasen y col., 2006). Esta alteración proliferativa, que potencialmente promueve la inestabilidad genómica y la tumorigénesis (Khanna y Jackson, 2001; van Gent y col., 2001; Nyberg y col., 2002; Syljuasen, 2007), se observó en las células Vero una vez retirados los tratamientos con BHA 300  $\mu\text{M}$  o *Mix 100* y puede considerarse un signo de toxicidad adicional y retardada. Finalmente, a pesar de la dificultad para establecer comparaciones entre datos obtenidos *in vivo* e *in vitro*, es importante señalar que la exposición a BHA induce lesiones preneoplásicas y neoplásicas en el riñón de rata (Tsuda y col., 1984), que pueden conducir a la formación de tumores por hiperplasia regenerativa (Kumar y col., 2008).

Por otra parte, los análisis matemáticos de los datos obtenidos con *Mix 100* indicaron que ningún modelo predictivo destaca sobre el resto, a la hora de presentar estimas correctas en los estudios de exposición retardada. Para el parámetro de incremento de la cantidad de células en el cultivo no se obtuvieron respuestas predecibles después de 24 ó 48 horas de recuperación. Sin embargo, para la variación del porcentaje de células en G2-M tras 48 horas de recuperación, los modelos de correlación negativa completa y sin correlación aportaron predicciones correctas. En cuanto a la frecuencia de células positivas a  $\gamma\text{-H2AX}$ , la estima basada en los datos de las exposiciones individuales mostró valores esperados inferiores a

los detectados en la mezcla, empleando los modelos de correlación positiva y negativa completa y sin correlación. En cambio, se estimó con acierto este efecto en base al modelo de correlación negativa completa modificado para estudios de genotoxicidad.

Antes de concluir el estudio, llevamos a cabo una aproximación experimental basada en la tecnología de microarrays de ADNc, considerada como un herramienta de gran utilidad para el análisis del mecanismo de acción tóxica de compuestos químicos (Furness, 2002; Waring y Halbert, 2002), así como de sus mezclas (Borgert, 2007). Es importante puntualizar que, si bien el microarray utilizado permitió detectar cambios de expresión génica en las células Vero, los resultados no se pudieron validar al carecer de cebadores de la calidad necesaria. Por lo tanto, aunque los datos de estos ensayos complementaron en gran medida los obtenidos mediante parámetros clásicos de toxicidad *in vitro*, los hemos considerado como meramente especulativos. Asimismo, el estudio sólo se pudo realizar en células expuestas a la combinación binaria *Mix 100* y sus componentes individuales, ya que los cultivos expuestos a *Mix 300* presentaban niveles de ARNm insuficientes. Teniendo en cuenta nuestros resultados así como las características del microarray, el análisis se centró fundamentalmente en los cambios de expresión génica relacionados con el control del ciclo celular.

El ciclo celular está regulado por la acción de al menos tres familias de proteínas: las ciclinas (CCNs), las kinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y los inhibidores de las CDKs (CKIs). Las ciclinas se unen a las CDKs y forman complejos que se activan mediante una kinasa activadora de CDKs (CAK) que comprende tres subunidades, CDK7, ciclina H y MAT1 (Lolli y Johnson, 2005). Una vez activadas, las CDKs pueden fosforilar proteínas diana que permiten la progresión del ciclo celular. En las células de mamífero el ciclo de división celular depende de la actividad de tres CDKs, que actúan en interfase (CDK2, CDK4 y CDK6), una CDK mitótica (CDK1) y diez ciclinas pertenecientes a los tipos A, B, C, D y E (Malumbres y Barbacid, 2009). La actividad de los complejos ciclina/CDKs está regulada negativamente por dos familias de CKIs, las proteínas INK4 (p15, p16, p18, p19) y la familia CIP/KIP que comprende p21, p27 y p57 (Malumbres y Barbacid, 2005).

Como resultado de los diferentes tratamientos, las células Vero sufrieron una represión de la transcripción de genes de las ciclinas, que explicaría el bloqueo de la proliferación. Sin embargo observamos dos excepciones, la *ciclina E2* y la *ciclina H* que presentaban un incremento de los niveles de expresión en células expuestas a *Mix 100*. La sobreexpresión de *ciclinas E*, que se asocian con CDK2 y regulan la transición G1-S (Suryadinata y col., 2010), acelera la entrada en la fase S del ciclo celular y promueve la poliploidía (Spruck y col., 1999; Lindahl y col., 2004; Matsumoto y Maller, 2004). Es importante destacar además que *Mix 100* reprimió la transcripción de la proteinkinasa 2 asociada a la fase S (*SKP2*), un enzima perteneciente a la familia F-box que constituye una de las cuatro subunidades del complejo ubiquitina ligasa SCF (Cardozo y Pagano, 2004). SCF<sup>Skp2</sup> opera en la progresión G1-S y se ocupa principalmente de la degradación de CKIs de la familia CIP/KIP (Reed, 2006). Asimismo, se ha demostrado que la ciclina E debe unirse específicamente a SKP2 para su ubiquitinación, tanto *in vivo* como *in vitro* (Nakayama y col., 2000). Por lo tanto podemos asumir que los bajos niveles de *SKP2*, en los cultivos tratados con *Mix 100*, sean los responsables de la acumulación de la ciclina E2 y como consecuencia de la aparición de células poliploides. Finalmente, resaltar que diversos estudios han demostrado que la sobreexpresión de la ciclina E2 contribuye a la iniciación o progresión de un gran número de tumores humanos (Donnellan y Chetty, 1999; Gudas y col., 1999; Payton y Coats, 2002; Lindahl y col., 2004). Por otra parte, los niveles de expresión de los genes de *ciclina*

*H* también se encontraban incrementados en las células Vero después de la exposición a *Mix 100*. Como ya hemos mencionado, el complejo ciclina H/CDK7 está implicado en la activación de CDKs, pero además controla la transcripción de la ARN polimerasa II, al formar parte del factor de transcripción IIH (Fisher, 2005). Del mismo modo que la ciclina E2, la sobreexpresión de la ciclina H ha sido asociada en ocasiones con procesos neoplásicos (Bondi y col., 2005; Kayaselcuk y col., 2006).

La expresión génica de CDKs implicadas en la progresión del ciclo celular se vió también alterada como resultado de los diferentes tratamientos experimentales. La exposición a *Mix 100* causó una disminución significativa respecto al control de los niveles de ARNm de *CDK2* y *CDK1*, sin que se detectaran variaciones en *CDK4*. En el caso de los tratamientos individuales, las respuestas inducidas por PPB fueron muy similares a las observadas en la mezcla, mientras que el BHA no indujo cambios. Asimismo, otras CDKs reguladoras de la transcripción como *CDK7*, *CDK9* y *CDK10* (Malumbres y Barbacid, 2005), presentaron sus niveles de expresión alterados en mayor o menor medida, después de la exposición a la mezcla o a sus componentes individuales.

Por otra parte, la exposición de las células Vero a *Mix 100* y PPB 500  $\mu$ M tuvo como consecuencia la sobreexpresión génica de los CKIs *p21* y *p57*. Ambas proteínas se unen por el extremo N-terminal a los complejos ciclina/CDK inhibiendo su actividad kinasa y por el extremo C-terminal, al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), impidiendo su función como cofactor de la ADN polimerasa  $\delta$  (Chen y col., 1995; Watanabe y col., 1998). Por lo tanto, la activación del punto de control G1 implica tanto la inhibición de CDKs como de PCNA, aunque la importancia relativa de cada dominio en el bloqueo de la proliferación depende del tipo celular o del daño detectado (Luo y col., 1995; Rousseau y col., 1999). En situaciones de daño oxidativo, se ha demostrado que los dos dominios de *p21* participan en la inhibición de la progresión de G1-S (Helt y col., 2004), aunque la disminución de PCNA es crítica para asegurar una eficaz parada de la proliferación en la fase G1 (Gehen y col., 2007). En este punto es importante señalar que en paralelo con el incremento de *p21*, las células Vero tratadas con la mezcla y el PPB reprimieron la transcripción de *PCNA*, mientras que la exposición a BHA 100  $\mu$ M no mostró variación en los niveles de ARNm. Por lo tanto, la sobreexpresión de *p21* y *p57* junto con la represión de *CDK2* y *PCNA* justificarían el bloqueo de las células Vero en G0-G1, detectado previamente mediante los análisis por citometría de flujo.

La transcripción de *p21* es controlada por *p53*, un componente esencial de la respuesta de daño al ADN, que no sólo detiene el ciclo celular sino que induce apoptosis cuando las lesiones en el material genético resultan irreparables (Collavin y col., 2010; Farnebo y col., 2010). En nuestras condiciones experimentales, los niveles de expresión de la kinasa *ATM* responsable de la fosforilación de *p53* sólo se vieron aumentados significativamente en células tratadas con *Mix 100*. Por otra parte, se detectaron incrementos no significativos de *p53* en los cultivos expuestos a la mezcla, mientras que en el caso de los tratamientos individuales los valores no diferían de los obtenidos en los controles. Teniendo en cuenta que *p53* tiene una vida media corta (Sionov y Haupt, 1999) y que el resto de nuestros resultados apuntan a una eficaz activación del punto de control G1, consideramos que la extensa duración de los tratamientos experimentales (24 horas) podría justificar los bajos niveles observados.

Finalmente, los datos procedentes del microarray indicaron que la expresión génica de *polo-like kinasa 1 (PLK1)* se encontraba reprimida en los cultivos tratados con *Mix 100* ó PPB 500  $\mu$ M. Diversos estudios sugieren que *PLK1* es requerida para la progresión del ciclo celular (Barr y col., 2004), ya que regula no sólo eventos

específicos de la mitosis sino también la síntesis y mantenimiento de la integridad de ADN y la muerte celular (Ando y col., 2004; van Vugt y col., 2005; Strebhardt y Ullrich, 2006; Yang y col., 2009; Yim y Erikson, 2009). En general, la transcripción de *PLK* se inhibe al activarse el punto de control de daño al ADN con el fin de impedir la entrada de células en división (Ree y col., 2003).

La imposibilidad de disponer de datos cuantitativos sobre las variaciones en la expresión génica, nos llevó a seleccionar las proteínas que consideramos más relevantes (ciclina E, p53, p21 y PLK1) para realizar un análisis por western blot. En este caso incluimos además los tratamientos con 300  $\mu$ M de BHA y *Mix 300* para obtener datos adicionales.

Los resultados de la ciclina E revelaron que no existían variaciones en los cultivos tratados con BHA o PPB, pero se observó una reducción significativa de dicha proteína después de la exposición a las combinaciones binarias. Es importante señalar que, para los tratamientos individuales, se percibe una buena concordancia de resultados entre los estudios de expresión génica y los de western blot. Sin embargo, en el caso de *Mix 100* la sobreexpresión génica no se correspondía con los niveles de proteína detectados en los cultivos. La disminución del contenido de complejos ciclina/CDKs, mediante degradación por el proteasoma, es una característica de las situaciones de estrés hiposmótico (Tao y col., 2002) para evitar la progresión del ciclo celular.

Los niveles de p53 mostraron un incremento significativo en todas las condiciones experimentales, que puede explicarse en base a la respuesta de daño al ADN por la presencia de roturas de doble cadena. El valor máximo de contenido de p53 se obtuvo en los cultivos expuestos a *Mix 300*, lo que concuerda con los daños irreversibles en el ADN y la muerte celular inducida por este tratamiento. Por otra parte, los valores de contenido de la proteína p21, se encontraron en consonancia con los resultados del estudio de expresión génica. Estos datos explican las paradas de ciclo en G0-G1 inducidas por *Mix 100* y PPB y el hecho de que los cultivos tratados con BHA 100  $\mu$ M no presenten el mismo bloqueo de proliferación. Asimismo se observó un incremento en los niveles de p21 en las células expuestas a BHA 300  $\mu$ M, que también detienen su ciclo en G0-G1. La respuesta más destacada fue la inducida por *Mix 300*, donde se redujo la cantidad de p21 respecto al control, a pesar del incremento en p53 mencionado anteriormente. Los problemas de coordinación entre p53 y p21 después de daños en el ADN, tienen graves consecuencias en las células, entre las que se incluye la imposibilidad de mantener un bloqueo sostenido en los puntos de control del ciclo (Waldman y col., 1996, 1997) y la inducción de apoptosis (Seoane y col., 2002).

Finalmente, los datos para PLK1 demostraron que la proteína presentaba incrementos significativos en los tratamientos con PPB 500  $\mu$ M y *Mix 100*, no variaba después de la exposición individual a BHA y disminuían sus valores en el tratamiento con *Mix 300*. Estos resultados resultan paradójicos, ya que los niveles de ARNm analizados mediante el microarray indicaban que se encontraba reprimida en todos los tratamientos analizados. Teniendo en cuenta que el ciclo celular está bloqueado, es probable que la actividad de PLK se encuentre inhibida, un efecto que parece ser frecuente cuando se activa la ruta de daño al ADN (Jang y col., 2007).

Considerando que la identificación de genes proporciona una nueva forma de entender las respuestas celulares, comprobamos si existían variaciones detectables por *CholestChip*<sup>TM</sup> en las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK). Las MAPK son una familia de proteínas muy conservadas, que median en un gran número de vías de señalización activadas por diversos tipos de estrés (Widmann y



col., 1999; Avruch, 2007). En los mamíferos, se ha demostrado que las alteraciones del volumen celular modulan fundamentalmente la actividad de la kinasa extracelular reguladora (ERK1/2), la kinasa amino-terminal c-jun (JNK) y la kinasa p38 (Lambert y col., 2008). Sin embargo, las respuestas son muy variables y dependen tanto de las condiciones como del tipo celular, por lo que se ha sugerido que la activación de las rutas de MAPK podría representar simplemente una respuesta de estrés general (Hoffmann y col., 2009).

En nuestras condiciones experimentales, se observó un incremento de la expresión de *JNK1* en los cultivos tratados con *Mix 100* y sus componentes individuales, aunque los valores sólo eran significativos en el caso de la exposición a PPB 500  $\mu$ M. Estos resultados coinciden en parte con los descritos por otros autores en células HeLa y HepG2, en los que la exposición a BHA incrementa la actividad de JNK1 (Yu y col., 1997). En cuanto al propilparabeno, los datos de este estudio son los primeros que relacionan la activación de una ruta de MAPK con el mecanismo de acción que presenta el compuesto. Sin embargo, no son de extrañar teniendo en cuenta la naturaleza fenólica del PPB y la implicación de la JNK1 en la respuesta celular a estrés oxidativo (Kong y col., 2001).

Por otra parte, nuestros resultados revelaron otras situaciones relacionadas con la activación de la respuesta de estrés hipotónico. Así por ejemplo, se detectaron aumentos en la expresión de ciertas integrinas en las células Vero expuestas a *Mix 100* y a sus componentes individuales. Las integrinas son moléculas de adhesión que conectan la matriz extracelular con las proteínas de señalización intracelular y el citoesqueleto de actina (Calderwood, 2004). Estas proteínas actúan como sensores del volumen celular, en situaciones de estrés osmótico (Pedersen y col., 2001; Haussinger y col., 2006), aumentando sus niveles en la membrana plasmática en caso de hinchazón celular (Schliess y col., 2004). Asimismo, las caveolinas mostraron incrementos de transcripción, siendo especialmente significativos después del tratamiento con la mezcla. Las caveolinas son una familia de proteínas integrales de membrana, localizadas en las balsas lipídicas o “rafts”, que originan invaginaciones denominadas caveolas (Cohen y col., 2004; Thomas y Smart, 2008; Parat, 2009). Estos microdominios de membrana tienen un papel fundamental en los procesos de endocitosis y transcitosis así como en un gran número de vías de transducción de señales (Parton y Simons, 2007; Patel y col., 2008; Lajoie y col., 2009). En nuestras condiciones experimentales, la sobreexpresión génica de las caveolinas resulta de gran interés, debido a que estas proteínas participan tanto en la señalización redox (Patel y Insel, 2009), como en el mecanismo DRV de respuesta a estrés hipotónico, modulando la actividad de los canales de Cl<sup>-</sup> (Trouet y col., 1999; Hoffmann y col., 2009).

Por último resaltar que el gen que codifica para la *clusterina* (*CLU*) presentó incrementos significativos después de la exposición de las células Vero a *Mix 100* ó a sus componentes individuales. La clusterina es una glicoproteína heterodimérica funcionalmente implicada en la reparación del ADN, la regulación del ciclo celular y la muerte celular por apoptosis (Wilson y Easterbrook-Smith, 2000; Shannan y col., 2006). Teniendo en cuenta las características de nuestro estudio, es fundamental indicar que la sobreexpresión de *CLU* aparece como respuesta al daño renal en diversos modelos experimentales, por lo que se le considera actualmente un biomarcador de nefrotoxicidad (Amin y col., 2004; Thukral y col., 2005; Ishii y col., 2007; Bonventre y col., 2010). Asimismo, se observan incrementos en la expresión de *CLU* como consecuencia de la radiación ionizante, el estrés térmico y el estrés oxidativo, entre otros estímulos nocivos (Trogakos y Gonos, 2002) y se asocia con la progresión de tumores (Trogakos y Gonos, 2006; Flanagan y col., 2010; Rizzi y Bettuzzi, 2010), debido a su actividad antiapoptótica (Ranney y col., 2007). En

nuestras condiciones experimentales, los niveles máximos de sobreexpresión de *CLU* se detectaron en los cultivos tratados con PPB 500  $\mu$ M. Este resultado es de gran interés ya que los parabenos habían sido relacionados con el cáncer de mama (Darbre y col., 2004; Darbre y Harvey, 2008), pero de momento no existen datos acerca de su posible capacidad nefrotóxica.

El análisis de los datos del microarray se llevó a cabo mediante bloques (*clusters*) con el fin de relacionar los genes que presentan respuestas similares en los diferentes tratamientos experimentales. De este modo y aplicando la asociación de efectos, existen secuencias que se ven alterada su expresión en presencia de la mezcla y uno de los componentes por separado, lo que permite sugerir que la disfunción observada en la exposición combinada es inducida por un tratamiento individual concreto. En esta situación destacan *PLK*, *CDK2*, *PCNA* y *CDC2*, cuya respuesta en el tratamiento *Mix 100* parece deberse a la presencia de PPB 500  $\mu$ M. En la situación inversa encontramos los genes de *ciclinas B* y *D1* y *SKP2*, en los que el efecto de la mezcla se podría explicar según la respuesta obtenida tras la exposición a BHA 100  $\mu$ M. Asimismo detectamos respuestas que surgen exclusivamente por efecto de la combinación binaria que incluyen las de *ATM*, *p53*, *p21*, *CCNE2*, *CAV2* e *ITGAX*.

Del mismo modo, evaluamos los resultados de los estudios de western blot, en los que se observan, según el modelo de correlación negativa completa, respuestas antagónicas en todos los análisis del efecto combinado de *Mix 300* excepto para p53, que resultó sinérgico. Por otra parte, las respuestas obtenidas para *Mix 100* fueron más predecibles, como se observa para PLK y p53. Sin embargo, en los casos de p21 y CCNE nuestra predicción siempre resultó más elevada que la que pudimos cuantificar, lo que indica que ambas respuestas son antagónicas.

Tomando todos nuestros resultados en su conjunto, podemos concluir que la exposición a las combinaciones binarias de los aditivos autorizados BHA y PPB desencadena múltiples alteraciones fisiológicas, principalmente derivadas de un desequilibrio osmótico, que pueden llegar a desencadenar procesos de muerte. Asimismo hemos comprobado que, a pesar de la diversidad de modelos matemáticos empleados, la estima de los resultados no presenta en general buenos ajustes con las respuestas celulares observadas. Sin embargo, nuestros datos revelan que la toxicidad resultante de la exposición a una combinación binaria de productos químicos, puede preverse una vez definidos el mecanismo de acción de sus componentes de manera individual. Es interesante destacar además la importancia de los ensayos de reversibilidad o toxicidad retardada ya que, como indican nuestros resultados, pueden aportar una información adicional de gran relevancia. Finalmente, este estudio demuestra que los efectos tóxicos detectados como resultado de la exposición de las células Vero a las dos mezclas analizadas (*Mix 100* y *Mix 300*) son muy similares, aunque de distinta intensidad, y por lo tanto corresponden a un mecanismo de acción común. En este sentido, proponemos que las aproximaciones por analogía (*read across*) deben considerarse de gran utilidad a la hora de abordar el análisis de mezclas químicas potencialmente tóxicas.





## Conclusiones



- i. Una adecuada evaluación *in vitro* de la toxicidad de productos químicos así como de sus mezclas debe fundamentarse en la utilización simultánea de parámetros cuantitativos y cualitativos.
- ii. Las mezclas analizadas de BHA y PPB inducen en las células Vero una situación de estrés hipotónico que depende en gran medida de cambios en el potencial redox intracelular.
- iii. El desequilibrio osmótico causado por los tratamientos experimentales se encuentra asociado con importantes alteraciones funcionales que incluyen, desajustes en la progresión del ciclo celular, incrementos en la ploidía, lesiones en el ADN por daño oxidativo y muerte celular.
- iv. Los cambios en la fisiología celular resultantes de la exposición a BHA, PPB y sus combinaciones binarias comprometen la integridad de los principales orgánulos y del citoesqueleto de las células Vero.
- v. La retirada de los tratamientos experimentales induce en las células Vero una respuesta de toxicidad retardada consistente en desajustes en el ciclo celular asociados con incrementos de la proliferación.
- vi. El diseño experimental utilizado ha resultado ser una eficaz herramienta de trabajo para determinar el mecanismo de acción tóxica de ambos aditivos y sus mezclas.
- vii. De manera general, los diferentes modelos de estima utilizados para el análisis del efecto combinado no mostraron un buen ajuste con las respuestas observadas.
- viii. El efecto tóxico inducido por las mezclas en las células Vero puede predecirse de manera cualitativa una vez definidos los mecanismos de acción de los componentes individuales.





## Bibliografía



- Abe, S. y Sasaki, M. (1977). "Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in chinese hamster cells exposed to various chemicals". *Journal of the National Cancer Institute* 58: 1635-1641.
- Aldamassi, M., Chen, Z., Merriman, B., Gussin, D. y Nelson, S. (2001). "A practical guide to microarray analysis of gene expression". Último acceso 31 de julio de 2010, en <http://www.genetics.ucla.edu/microarray>, actualmente en <http://biowww.net/detail-872.html>.
- Altenburger, R. y Greco, W. (2009). "Extrapolation concepts for dealing with multiple contamination in environmental risk assessment". *Integrated Environmental Assessment and Management* 5: 62-69.
- Allanou, R., Hansen, B. y van der Bilt, Y. (1999). "Public availability of data on EU high production volume chemicals". European Chemicals Bureau, Ispra (Italia). 1-25.
- Allanou, R., Hansen, B. y Van der Bilt, Y. (2003a). "Public availability of data on EU high production volume chemicals. Part 1". European Chemicals Bureau, Ispra (Italia). 91-95.
- Allanou, R., Hansen, B. y Van der Bilt, Y. (2003b). "Public availability of data on EU high production volume chemicals. Part 2". European Chemicals Bureau, Ispra (Italia). 59-64.
- Amin, R. A., Vickers, A. E., Sistare, F., Thompson, K. L., Roman, R. J., Lawton, M., Kramer, J., Hamadeh, H. K., Collins, J., Grissom, S., Bennett, L., Tucker, C. J., Wild, S., Kind, C., Oreffo, V., Davis, J. W., Curtiss, S., Naciff, J. M., Cunningham, M., Tennant, R., Stevens, J., Car, B., Bertram, T. A. y Afsharil, C. A. (2004). "Identification of putative gene-based markers of renal toxicity". *Environmental Health Perspectives* 112: 465-479.
- Ando, K., Ozaki, T., Yamamoto, H., Furuya, K., Hosoda, M., Hayashi, S., Fukuzawa, M. y Nakagawara, A. (2004). "Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation". *The Journal of Biological Chemistry* 279: 25549-25561.
- Andreozzi, R., Marotta, R. y Nicklas, P. (2003). "Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment". *Chemosphere* 50: 1319-1330.
- Andreozzi, R., Marotta, R., Pinto, G. y Pollio, A. (2002). "Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity". *Water Research* 36: 2869-2877.
- Andreyev, A. I., Kushnareva, Y. E. y Starkov, A. A. (2005). "Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species". *Biochemistry-Moscow* 70: 200-214.
- Ascherio, A., Chen, H., Weisskopf, M., O'Reilly, E., McCullough, M., Calle, E., Schwarzschild, M. y Thun, M. (2006). "Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease". *Annals of Neurology* 60: 197-203.
- Asnani, V. y Verma, R. (2006). "Aqueous ginger extract ameliorates paraben induced cytotoxicity". *Acta Poloniae Pharmaceutica* 63: 117-119.
- Asnani, V. y Verma, R. (2007). "Antioxidative effect of rhizome of *Zinziber officinale* on paraben induced lipid peroxidation: an in vitro study". *Acta Poloniae Pharmaceutica* 64: 35-37.
- Avruch, J. (2007). "MAP kinase pathways: The first twenty years". *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1773: 1150-1160.
- Barr, F., Sillje, H. y Nigg, E. (2004). "Polo-like kinases and the orchestration of cell division". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 429-440.
- Bartek, J. y Lukas, J. (2007). "DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation". *Current Opinion in Cell Biology* 19: 238-245.
- Berenbaum, M. (1977). "Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression". *Clinical and Experimental Immunology* 28: 1-18.
- Berenbaum, M. (1981). "Criteria for analyzing interactions between biologically active agents". *Advances in Cancer Research* 35: 269-335.
- Berenbaum, M. (1985). "The expected effect of a combination of agents: the general solution". *Journal of Theoretical Biology* 114: 413-431.
- Berenbaum, M. (1989). "What is synergy?" *Pharmacological Reviews* 41: 93-141.

- Bergfeld, W., Belsito, D., Marks, J. J. y Andersen, F. (2005). "Safety of ingredients used in cosmetics." *Journal of the American Academy of Dermatology* 52: 125-132.
- Bjerregaard, P., Andersen, D., Pedersen, K., Pedersen, S. y Korsgaard, B. (2003). "Estrogenic effect of propylparaben (propylhydroxybenzoate) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after exposure via food and water." *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. Toxicology & Pharmacology* 136: 309-317.
- Bliss, C. (1939). "The toxicity of poisons applied jointly". *Annals of Applied Biology* 26: 586-615.
- Bondi, J., Husdal, A., Bukholm, G., Nesland, J. M., Bakka, A. y Bukholm, I. R. K. (2005). "Expression and gene amplification of primary (A, B1, D1, D3, and E) and secondary (C and H) cyclins in colon adenocarcinomas and correlation with patient outcome". *Journal of Clinical Pathology* 58: 509-514.
- Bonventre, J. V., Vaidya, V. S., Schmouder, R., Feig, P. y Dieterle, F. (2010). "Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity". *Nature Biotechnology* 28: 436-440.
- Borenfreund, E. y Puerner, J. (1985). "Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption". *Toxicology Letters* 24: 119-124.
- Borgert, C. J. (2007). "Predicting interactions from mechanistic information: Can omic data validate theories?" *Toxicology and Applied Pharmacology* 223: 114-120.
- Borgert, C. J., Quill, T. F., McCarty, L. S. y Mason, A. M. (2004). "Can mode of action predict mixture toxicity for risk assessment?" *Toxicology and Applied Pharmacology* 201: 85-96.
- Bound, J. y Voulvoulis, N. (2005). "Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom". *Environmental Health Perspectives* 113: 1705-1711.
- Box, G. (1979). "Robustness in the strategy of scientific model building". En: *Robustness in Statistics*. R. Launer y G. Wilkinson (Eds), Academic Press (New York), pp. 201-235.
- Boyd, G., Palmeri, J., Zhang, S. y Grimm, D. (2004). "Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA." *Science of the Total Environment* 333: 137-148.
- Bradford, M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brain, R., Johnson, D., Richards, S., Hanson, M., Sanderson, H., Lam, M., Young, C., Mabury, S., Sibley, P. y Solomon, K. (2004). "Microcosm evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum*". *Aquatic Toxicology* 70: 23-40.
- Braune, B. M., Outridge, P. M., Fisk, A. T., Muir, D. C. G., Helm, P. A., Hobbs, K., Hoekstra, P. F., Kuzyk, Z. A., Kwan, M., Letcher, R. J., Lockhart, W. L., Norstrom, R. J., Stern, G. A. y Stirling, I. (2005). "Persistent organic pollutants and mercury in marine biota of the Canadian Arctic: An overview of spatial and temporal trends". *Science of the Total Environment* 351-352: 4-56.
- Bredin, J., Davin-Regli, A. y Pages, J. M. (2005). "Propyl paraben induces potassium efflux in *Escherichia coli*". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55: 1013-1015.
- Brown, T., Rumsby, P., Capleton, A., Rushton, L. y Levy, L. (2006). "Pesticides and parkinson's disease - is there a link?" *Environmental Health Perspectives* 114: 156-164.
- Brun, G., Bernier, M., Losier, R., Doe, K., Jackman, P. y Lee, H. (2006). "Pharmaceutically active compounds in Atlantic Canadian sewage treatment plant effluents and receiving waters, and potential for environmental effects as measured by acute and chronic aquatic toxicity". *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC* 25: 2163-2176.
- Burger, J. (2007). "A framework and methods for incorporating gender-related issues in wildlife risk assessment: Gender-related differences in metal levels and other contaminants as a case study". *Environmental Research* 104: 153-162.

- Burger, J., Fossi, C., McClellan-Green, P. y Orlando, E. F. (2007). *"Methodologies, bioindicators, and biomarkers for assessing gender-related differences in wildlife exposed to environmental chemicals"*. Environmental Research 104: 135-152.
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A. y Chen, D. J. (2001). *"ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks"*. The Journal of Biological Chemistry 276: 42462-42467.
- Burrows, C. J. y Muller, J. G. (1998). *"Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission"*. Chemical Reviews 98: 1109-1152.
- Bursey, J. y Pellizzari, E. (1982). *"Analysis of industrial wastewater for organic pollutants in consent decree survey"*. USEPA Environmental Research Laboratory. Contract Number 68-03-2867. U.S. Environmental Protection Agency, Athens (Georgia, EE.UU.). 34 pp.
- Butterworth, B. E. y Bogdanffy, M. S. (1999). *"A comprehensive approach for integration of toxicity and cancer risk assessments"*. Regulatory Toxicology and Pharmacology 29: 23-36.
- Butterworth, B. E., Popp, J. A., Conolly, R. B. y Goldsworthy, T. L. (1992). *"Chemically induced cell proliferation in carcinogenesis"*. IARC Scientific Publications 116: 279-305.
- Bychkov, R., Pieper, K., Ried, C., Milosheva, M., Bychkov, E., Luft, F. C. y Haller, H. (1999). *"Hydrogen peroxide, potassium currents, and membrane potential in human endothelial cells"*. Circulation 99: 1719-1725.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J. P., Ravanat, J. L. y Sauvaigo, S. (1999). *"Hydroxyl radicals and DNA base damage"*. Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 424: 9-21.
- Calabrese, E. J. (2008a). *"Hormesis and mixtures"*. Toxicology and Applied Pharmacology 229: 262-263.
- Calabrese, E. J. (2008b). *"Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists"*. Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC 27: 1451-1474.
- Calderon, R. (2000). *"The epidemiology of chemical contaminants of drinking water"*. Food and Chemical Toxicology 38: S13-S20.
- Calderwood, D. A. (2004). *"Integrin activation"*. Journal of Cell Science 117: 657-666.
- Cann, K. y Hicks, G. (2007). *"Regulation of the cellular DNA double-strand break response"*. Biochemical and Cell Biology 85: 663-674.
- Canosa, P., Rodríguez, I., Rubí, E., Bollaín, M. y Cela, R. (2006). *"Optimization of a solid-phase microextraction method for the determination of parabens in water samples at the low ng per litre level"*. Journal of Chromatography A 1124: 3-10.
- Carballa, M., Omil, F., Ternes, T. y Lema, J. (2007). *"Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge"*. Water Research 41: 2139-2150.
- Cardozo, T. y Pagano, M. (2004). *"The SCF ubiquitin ligase: Insights into a molecular machine"*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 5: 739-751.
- Caress, S. M. y Steinemann, A. C. (2004). *"Prevalence of Multiple Chemical Sensitivities: A Population-Based Study in the Southeastern United States"*. American Journal of Public Health 94: 746-747.
- Carter, W., Narayanan, P. y Robinson, J. (1994). *"Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells."* Journal of Leukocyte Biology 55: 253-258.
- Cassee, F., Groten, J., van Bladeren, P. y Feron, V. (1998). *"Toxicological Evaluation and Risk Assessment of Chemical Mixtures"*. Critical Reviews in Toxicology 28: 73-101.
- Castañó, A., Bols, N., Braunbeck, T., Dierickx, P., Halder, M., Isomaa, B., Kawahara, K., Lee, L., Mothersill, C., Pärt, P., Repetto, G., Sintes, J., Ruffi, H., Smith, R., Wood, C., Segner, H. y 47, E. W. (2003). *"The use of fish cells in ecotoxicology. The report and recommendations of ECVAM Workshop 47."* Alternatives to Laboratory Animals 31: 317-351.

- Castaño, A. y Gómez-Lechón, M. (2005). "Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: a literature survey". *Toxicology in Vitro* 19: 695-705.
- Cedergreen, N., Christensen, A., Kamper, A., Kudsk, P., Mathiassen, S., Streibig, J. y Sorensen, H. (2008). "A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites". *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC* 27: 1621-1632.
- Chen, J., Ahn, K., Gee, N., Gee, S., Hammock, B. y Lasley, B. (2007). "Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products." *Toxicology and Applied Pharmacology* 221: 278-284.
- Chen, J. J., Jackson, P. K., Kirschner, M. W. y Dutta, A. (1995). "Separate domains of p21 involved in the inhibition of CDK kinase and PCNA". *Nature* 374: 386-388.
- Chen, L. (1988). "Mitochondrial membrane potential in living cells". *Annual Review of Cell Biology* 4: 155-181.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.
- Chou, J. y Chou, T. (1987). "Dose-effect analysis with microcomputers". Elsevier Science Publishers BV (Amsterdam).
- Chou, T. (2006). "Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies". *Pharmacological Reviews* 58: 621-681.
- Chou, T. y Talalay, P. (1984). "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors". *Advanced Enzyme Regulation* 22: 27-55.
- CIREP. (2008). "Final Amended Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in Cosmetic Products". *International Journal of Toxicology* 27: 1 - 82.
- Clemedson, C., Barile, F., Chesné, C., Cottin, M., Curren, R., Ekwall, B., Ferro, M., Gómez-Lechón, M., Imai, K., Janus, J., Kemp, R., Kerszman, G., Kjellstrand, P., Lavrijsen, K., Logenmann, P., McFarlane-Abdulla, E., Roguet, R., Segner, H., Seibert, H., Thuvander, A., Walum, E. y Ekwall, B. (2000). "MEIC evaluation of acute systemic toxicity: Part VII. Prediction of human toxicity by results from testing of the first 30 reference chemicals with 27 further in vitro assays". *Alternatives to Laboratory Animals* 28: 161-200.
- Clemenson, C. y Marsolier-Kergoat, M. C. (2009). "DNA damage checkpoint inactivation: Adaptation and recovery". *DNA Repair* 8: 1101-1109.
- Cleuvers, M. (2003). "Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects". *Toxicology Letters* 142: 185-194.
- Cleuvers, M. (2004). "Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59: 309-315.
- Cobo, E., Selva-O'Callaghan, A., Ribera, J.-M., Cardellach, F., Dominguez, R. y Vilardell, M. (2007). "Statistical Reviewers Improve Reporting in Biomedical Articles: A Randomized Trial". *PLoS ONE* 2: e332.
- Cohen, A. W., Hnasko, R., Schubert, W. y Lisanti, M. P. (2004). "Role of caveolae and caveolins in health and disease". *Physiological Reviews* 84: 1341-1379.
- Collavin, L., Lunardi, A. y Del Sal, G. (2010). "p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression". *Cell Death and Differentiation* 17: 901-911.
- Collins, F., Gray, G. y Bucher, J. (2008). "Toxicology. Transforming environmental health protection". *Science* 319: 906-907.

- Conacher, H., Iverson, F., Lau, P.-Y. y Page, B. (1986). "Levels of BHA and BHT in human and animal adipose tissue: interspecies extrapolation". Food and Chemical Toxicology 24: 1159-1162.
- Cowan-Ellsberry, C. E. y Robison, S. H. (2009). "Refining Aggregate Exposure: Example using Parabens". Regulatory Toxicology and Pharmacology 55: 321-329.
- Cui, J., Yang, H. y Lee, U. S. (2009). "Molecular mechanisms of BK channel activation". Cellular and Molecular Life Sciences 66: 852-875.
- Cunningham, V., Buzby, M., Hutchinson, T., Mastroco, F., Parke, N. y Roden, N. (2006). "Effects of human pharmaceuticals on aquatic life: next steps". Environmental Science & Technology 40: 3456-3462.
- Darbre, P., Aljarrah, A., Miller, W., Coldham, N., Sauer, M. y Pope, G. (2004). "Concentrations of parabens in human breast tumours". Journal of Applied Toxicology 24: 5-13.
- Darbre, P. y Harvey, P. (2008). "Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks". Journal of Applied Toxicology 28: 561-578.
- Daughton, C. y Ternes, T. (1999). "Pharmaceuticals and Personal Care Products in the environment: Agents of subtle change?" Environmental Health Perspectives 107: 907-938.
- Davi, M. y Gnudi, F. (1999). "Phenolic compounds in surface water". Water Research 33: 3213-3219.
- Decordier, I., Cundari, E. y Kirsch-Volders, M. (2008). "Survival of aneuploid, micronucleated and/or polyploid cells: Crosstalk between ploidy control and apoptosis". Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 651: 30-39.
- DeLorenzo, M. y Fleming, J. (2008). "Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals and personal care products on the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*". Archives of Environmental Contamination and Toxicology 54: 203-210.
- Denizot, F. y Lang, R. (1986). "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability". Journal of Immunological Methods 89: 271-277.
- Diaz, G., Diana, A., Falchi, A., Gremo, F., Pani, A., Batetta, B., Dessì, S. y Isola, R. (2001). "Intra- and intercellular distribution of mitochondrial probes and changes after treatment with MDR modulators". IUBMB Life 51: 121-126.
- Donnellan, R. y Chetty, R. (1999). "Cyclin E in human cancers". The FASEB Journal 13: 773-780.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function". Physiological Reviews 82: 47-95.
- Duesteberg, C. K. y Waite, T. D. (2007). "Kinetic modeling of the oxidation of p-hydroxybenzoic acid by Fenton's reagent: Implications of the role of quinones in the redox cycling of iron". Environmental Science & Technology 41: 4103-4110.
- EC. (2000). "First report on the harmonization of risk assessment procedures, Part 1". European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Bruselas (Bélgica). 173 pp.
- EC. (2006). Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council REgulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. Official Journal of the European Union. No 396: 1-849.

- ECETOC. (2001). *"Aquatic toxicity of mixtures". Technical Report No. 80*. Technical Report No. 80. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Bruselas (Bélgica). 64 pp.
- ECVAM. (1997). *"Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an in vitro test for phototoxic potential)"*. European Centre for the Validation of Alternative Methods, Ispra (Italia). 7 pp.
- ECVAM. (2002). *"Chapter 4: Acute lethal toxicity". En: Alternative (non-animal) methods for chemical testing: current status and future prospects*. European Centre for the Validation of Alternative Methods, Ispra (Italia). 27-33.
- Edwards, T. y Myers, J. (2007). *"Environmental exposures and gene regulation in disease etiology"*. Environmental Health Perspectives 115: 1264-1270.
- EEC. (1986). Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Official Journal of the European Communities, European Economic Community. L358: pp.29.
- Eguchi, K., Nagase, H., Ozawa, M., Endoh, Y., Goto, K., Hirata, K., Miyamoto, K. y Yoshimura, H. (2004). *"Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae"*. Chemosphere 57: 1733-1738.
- Eide, I., Neverdal, G., Thorvaldsen, B., Grung, B. y Kvalheim, O. (2002). *"Toxicological evaluation of complex mixtures by pattern recognition: correlating chemical fingerprints to mutagenicity"*. Environmental Health Perspectives 110: 985-988.
- EINECS. (2010). *"Inventario Europeo de Sustancias Químicas Comerciales Existentes"*. Último acceso 31 de julio de 2010, en <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/esis/index.php?PGM=ein>.
- Ekwall, B. (1995). *"The basal cytotoxicity concept"*. World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: Education, Research, Testing. (New York). Alternative Methods in Toxicology and the Life Sciences 11: 721-725.
- Ekwall, B., Silano, V., Paganuzzi-Stammati, A. y Zucco, F. (1990). *"Toxicity test with mammalian cell cultures"*. En: *Short-term toxicity test for non-genotoxic effects*. P. Bourdeau (Ed), John Wiley & Sons Ltd (New York), pp. 75-97.
- Elder, R. (1984). *"The cosmetic ingredient review--a safety evaluation program"*. Journal of the American Academy of Dermatology 11: 1168-1174.
- EPA. (1986). *"Guidelines for the the health risk assessment of chemical mixtures"*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. 38 pp.
- EPA. (2000). *"Supplementary guidance for conducting health risk assessment of chemical mixtures"*. U.S. Environmental Protection Agency. Office of Pollution Prevention and Toxics Risk Assessment Division, Washington, DC. 209 pp.
- Erxleben, C., Everhart, A. L., Romeo, C., Florance, H., Bauer, M. B., Alcorta, D. A., Rossie, S., Shipston, M. J. y Armstrong, D. L. (2002). *"Interacting effects of N-terminal variation and strex exon splicing on slo potassium channel regulation by calcium, phosphorylation, and oxidation"*. The Journal of Biological Chemistry 277: 27045-27052.
- Farnebo, M., Bykov, V. J. N. y Wiman, K. G. (2010). *"The p53 tumor suppressor: A master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer"*. Biochemical and Biophysical Research Communications 396: 85-89.
- Favier, A. (2006). *"Oxidative stress in human diseases"*. Annales Pharmaceutiques Francaises 64: 390-396.
- Fenández-Solà, J., Lluís Padierna, M., Nogué Xarau, S. y Munné Mas, P. (2005). *"Síndrome de fatiga crónica e hipersensibilidad química múltiple tras exposición a insecticidas"*. Medicina clínica 124: 451-453.
- Fernández Freire, P., Labrador, V., Pérez Martín, J. M. y Hazen, M. J. (2005). *"Cytotoxic effects in mammalian Vero cells exposed to pentachlorophenol"*. Toxicology 210: 37-44.



- Fernández Freire, P., Pérez Martín, J. M., Herrero, O., Peropadre, A., de la Peña, E. y Hazen, M. J. (2008). "In vitro assessment of the cytotoxic and mutagenic potential of perfluorooctanoic acid". *Toxicology in Vitro* 22: 1228-1233.
- Fernández Freire, P., Peropadre, A., Pérez Martín, J. M., Herrero, O. y Hazen, M. J. (2009). "An integrated cellular model to evaluate cytotoxic effects in mammalian cell lines". *Toxicology in Vitro* 23: 1553-1558.
- Feron, V., Cassee, F., Groten, J., van Vliet, P. y van Zorge, J. (2002). "International issues on human health effects of exposure to chemical mixtures". *Environmental Health Perspectives* 110: 893-899.
- Finney, D. (1942). "The analysis of toxicity tests on mixtures of poisons". *Annals of Applied Biology* 29: 82-94.
- Fisher, R. P. (2005). "Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription". *Journal of Cell Science* 118: 5171-5180.
- Fisk, A. T., Stern, G. A., Hobson, K. A., Strachan, W. J., Loewen, M. D. y Norstrom, R. J. (2001). "Persistent Organic Pollutants (POPs) in a Small, Herbivorous, Arctic Marine Zooplankton (*Calanus hyperboreus*): Trends from April to July and the Influence of Lipids and Trophic Transfer". *Marine Pollution Bulletin* 43: 93-101.
- Flanagan, L., Whyte, L., Chatterjee, N. y Tenniswood, M. (2010). "Effects of clusterin over-expression on metastatic progression and therapy in breast cancer". *BMC Cancer* 10: 107-120.
- Fodor, A. A. y Aldrich, R. W. (2009). "Convergent Evolution of Alternative Splices at Domain Boundaries of the BK Channel". *Annual Review of Physiology* 71: 19-36.
- Forbes, V., Hommen, U., Thorbek, P., Heimbach, F., Van den Brink, P., Wogram, J., Thulke, H. y Grimm, V. (2009). "Ecological models in support of regulatory risk assessments of pesticides: developing a strategy for the future". *Integrated Environmental Assessment and Management* 5: 167-172.
- Frantz, S. (2006). "The trouble with making combination drugs". *Nature Reviews Drug Discovery* 5: 881-882.
- Fraser, T. (1871). "An experimental research on the antagonism between the actions of physostigma and atropia". *Proceedings of Royal Society of Edinburgh* 7: 506-511.
- Fraser, T. (1872). "The antagonism between the actions of active substances". *The British Medical Journal* 2: 485-487.
- Frei, W. (1913). "Versuche über kombination von desinfektionnamitteln". *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten; medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Virologie* 75: 433-496.
- Fukumoto, L. y Mazza, G. (2000). "Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3597-3604.
- Furness, L. M. (2002). "Analysis of gene and protein expression for drug mode of toxicity". *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 5: 98-103.
- Fusi, F., Marazova, K., Pessina, F., Gorelli, B., Valoti, M., Frosini, M. y Sgaragli, G. (2000). "On the mechanisms of the antispasmodic action of some hindered phenols in rat aorta rings". *European Journal of Pharmacology* 394: 109-115.
- Fusi, F., Saponara, S., Gagov, H. y Sgaragli, G. (2001). "Effects of some sterically hindered phenols on whole-cell  $Ca^{2+}$  current of guinea-pig gastric fundus smooth muscle cells". *British Journal of Pharmacology* 132: 1326-1332.
- Fusi, F., Sgaragli, G. y Murphy, M. (1992). "Interaction of butylated hydroxyanisole with mitochondrial oxidative phosphorylation". *Biochemical Pharmacology* 43: 1203-1208.
- Gaddum, J. (1940). "Pharmacology". Oxford University Press (Londres), 407 pp.
- Galati, G., Sabzevari, O., Wilson, J. X. y O'Brien, P. J. (2002). "Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics". *Toxicology* 177: 91-104.

- Gehen, S. C., Vitiello, P. F., Bambara, R. A., Keng, P. C. y O'Reilly, M. A. (2007). "Downregulation of PCNA potentiates p21-mediated growth inhibition in response to hyperoxia". *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 292: L716-L724.
- Gennari, A., van den Berghe, C., Casati, S., Castell, J., Clemedson, C., Coecke, S., Colombo, A., Curren, R., Dal Negro, G., Goldberg, A., Gosmore, C., Hartung, T., Langezaal, I., Lessigiarska, I., Ryan, M., Schmuck, G., Stitzel, K., Stokes, W., Vericat, J. y Gribaldo, L. (2004). "Strategies to replace in vivo acute systemic toxicity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 50". *Alternatives to Laboratory Animals* 32: 437-459.
- Gennings, C., Carter, W., Jr., Campaign, J. A., Bae, D. y Yang, R. (2002). "Statistical analysis of interactive cytotoxicity in human epidermal keratinocytes following exposure to a mixture of four metals". *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* 7: 58-73.
- Gennings, C., Carter, W. J., Carchman, R., Teuschler, L., Simmons, J. y Carney, E. (2005). "A unifying concept for assessing toxicological interactions: changes in slope". *Toxicological Sciences* 88: 287-297.
- Ghatta, S., Nimmagadda, D., Xu, X. P. y O'Rourke, S. T. (2006). "Large-conductance, calcium-activated potassium channels: Structural and functional implications". *Pharmacology & Therapeutics* 110: 103-116.
- Gilliland, D., Li Wan Po, A. y Scott, E. (1992a). "The bactericidal activity of a methyl and propyl parabens combination: isothermal and non-isothermal studies". *The Journal of Applied Bacteriology* 72: 252-257.
- Gilliland, D., Li Wan Po, A. y Scott, E. (1992b). "Kinetic evaluation of claimed synergistic paraben combinations using a factorial design". *Journal of Applied Bacteriology* 72: 258-261.
- Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Tsikas, D. y Rossi, R. (2009). "Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers". *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 46.
- Glinton, G. (2005). "Multiple-chemical sensitivity". *Medsurg nursing: official journal of the Academy of Medical-Surgical Nurses* 14: 365-369.
- Golden, R., Gandy, J. y Vollmer, G. (2005). "A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health." *Critical Reviews in Toxicology* 35: 435-458.
- Goldin, A. y Mantel, N. (1957). "The employment of combinations of drugs in the chemotherapy of neoplasia: a review". *Cancer Research* 17: 635-654.
- Goldoni, M. y Johansson, C. (2007). "A mathematical approach to study combined effects of toxicants in vitro: evaluation of the Bliss independence criterion and the Loewe additivity model". *Toxicology in Vitro* 21: 759-769.
- Gómez-Ariza, J. L., Santos, M. M., Morales, E., Giráldez, I., Sánchez-Rodas, D., Vieira, N., Kemp, J. F., Boon, J. P. y Ten-Hallers-Tjabbes, C. C. (2006). "Organotin contamination in the Atlantic Ocean of the Iberian Peninsula in relation to shipping". *Chemosphere* 64: 1100-1108.
- Gómez-Lechón, M. y Castell, J. (1995). "The use of in vitro methods for the evaluation of the potential risk of toxicity of xenobiotics". En: *Cell Biology in Environmental Toxicology*. M. Cajaraville (Eds), University of the Basque Country Press Service (Bilbao), pp. 259-277.
- Gómez, E., Pillon, A., Fenet, H., Rosain, D., Duchesne, M., Nicolas, J., Balaguer, P. y Casellas, C. (2005). "Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: parabens, UV screens, and musks." *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 68: 239-251.
- Goodman, J. (2002). "Risk Assessment of Mixtures: Development of Testable Hypotheses as Science Input in to Policy Decisions". Results of the SOT's Expert Panel Workshop. (Atlanta). Society of Toxicology
- Gorla, G. R., Malhi, H. y Gupta, S. (2001). "Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells". *Journal of Cell Science* 114: 2943-2951.

- Greco, W., Bravo, G. y Parsons, J. (1995). *"The search for synergy: a critical review from a response surface perspective"*. Pharmacological Reviews 47: 331-385.
- Greco, W., Unkelbach, H., Pösch, G., Sühnel, J., Kundi, M. y Bödeker, W. (1992). *"Consensus on concepts and terminology for combined-action assessment: the Saariselkä agreement"*. Archives of Complex Environmental Studies 4: 65-69.
- Grigoriev, I., Chernobelskaya, A. y Vorobjev, A. (1997). *"Quantitative analysis of the movements of cytoplasmic granules in polarized fibroblasts"*. Membrane Cell Biology 11: 195-211.
- Groten, J. P., Feron, V. y Sühnel, J. (2001). *"Toxicology of simple and complex mixtures"*. Trends in Pharmacological Sciences 22: 316-322.
- Groten, J. P., Butler, W., Feron, V. J., Kozianowski, G., Renwick, A. G. y Walker, R. (2000). *"An Analysis of the Possibility for Health Implications of Joint Actions and Interactions between Food Additives"*. Regulatory Toxicology and Pharmacology 31: 77-91.
- Grung, M., Heimstad, E., Moe, M., Schlabach, M., Svenson, A., Thomas, K. y Woldegiorgis, A. (2007). *"Human and veterinary pharmaceuticals, narcotics, and personal care products in the environment"*. En: *Current state of knowledge and monitoring requirements by Norwegian Pollution Control Authority*. TA-2325/2007. Norwegian Institute for Water Research, Norwegian Institute for Air Research, and Swedish Environmental Research Institute, Oslo (Noruega). 95 pp.
- Gudas, J. M., Payton, M., Thukral, S., Chen, E., Bass, M., Robinson, M. O. y Coats, S. (1999). *"Cyclin E2, a novel G(1) cyclin that binds Cdk2 and is aberrantly expressed in human cancers"*. Molecular and Cellular Biology 19: 612-622.
- Gulden, M., Morchel, S. y Seibert, H. (2005). *"Comparison of mammalian and fish cell line cytotoxicity: impact of endpoint and exposure duration"*. Aquatic Toxicology 71: 229-236.
- Hafting, T., Haug, T. M., Ellefsen, S. y Sand, O. (2006). *"Hypotonic stress activates BK channels in clonal kidney cells via purinergic receptors, presumably of the P2Y(1) subtype"*. Acta Physiologica 188: 21-31.
- Hafting, T. y Sand, O. (2000). *"Purinergic activation of BK channels in clonal kidney cells (Vero cells)"*. Acta Physiologica Scandinavica 170: 99-109.
- Halliwell, B. (2008). *"Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?"* Archives of Biochemistry and Biophysics 476: 107-112.
- Halliwell, B. y Whiteman, M. (2004). *"Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?"* British Journal of Pharmacology 142: 231-255.
- Handa, O., Kokura, S., Adachi, S., Takagi, T., Naito, Y., Tanigawa, T., Yoshida, N. y Yoshikawa, T. (2006). *"Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes"*. Toxicology 227: 62-72.
- Harris, S. y Levine, A. (2005). *"The p53 pathway: positive and negative feedback loops"*. Oncogene 24: 2899-2908.
- Hartlerode, A. J. y Scully, R. (2009). *"Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells"*. The Biochemical Journal 423: 157-168.
- Hartung, T. (2008a). *"Food for thought... on animal tests"*. ALTEX 25: 3-9.
- Hartung, T. (2008b). *"Food for thought... on the evolution of toxicology and the phasing out of animal testing"*. ALTEX 25: 91-96.
- Harvey, P. y Darbre, P. (2004). *"Endocrine disrupters and human health: could oestrogenic chemicals in body care cosmetics adversely affect breast cancer incidence in women?"* Journal of Applied Toxicology 24: 167-176.
- Haussinger, D., Reinehr, R. y Schliess, F. (2006). *"The hepatocyte integrin system and cell volume sensing"*. Acta Physiologica 187: 249-255.

Heberer, T. (2002a). *"Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data"*. Toxicology Letters 131: 5-17.

Heberer, T. (2002b). *"Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water"*. Journal of Hydrology 266: 175-189.

Hebert, S. C., Desir, G., Giebisch, G. y Wang, W. H. (2005). *"Molecular diversity and regulation of renal potassium channels"*. Physiological Reviews 85: 319-371.

Helt, C. E., Stavarsky, R. J., Lee, Y. J., Bambara, R. A., Keng, P. C. y O'Reilly, M. A. (2004). *"The Cdk and PCNA domains on p21(Cip1) both function to inhibit G(1)/S progression during hyperoxia"*. American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology 286: L506-L513.

Henle, A. (1889). *"Ueber creolin und seine wirksamen bestandtheile"*. Archiv für Hygiene 9: 188-222.

Hertzberg, R. y Teuschler, L. (2002). *"Evaluating quantitative formulas for dose-response assessment of chemical mixtures"*. Environmental Health Perspectives 110: 965-970.

Hertzberg, R. C. y MacDonell, M. M. (2002). *"Synergy and other ineffective mixture risk definitions"*. Science of the Total Environment 288: 31-42.

Hignite, C. y Azarnoff, D. (1977). *"Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent."* Life Sciences 20: 337-341.

Hirose, M., Inoue, T., Asamoto, M., Tagawa, Y. y Ito, N. (1986). *"Comparison of the effects of 13 phenolic compounds in induction of proliferative lesions of the forestomach and increase in the labelling indices of the glandular stomach and urinary bladder epithelium of Syrian golden hamsters"*. Carcinogenesis 7: 1285-1289.

Hoffmann, E. K., Lambert, I. H. y Pedersen, S. F. (2009). *"Physiology of cell volume regulation in vertebrates"*. Physiological Reviews 89: 193-277.

Hoffmann, E. K. y Pedersen, S. F. (2006). *"Sensors and signal transduction pathways in vertebrate cell volume regulation"*. Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation 152: 54-104.

Hop, H., Borgá, K., Gabrielsen, G., Kleivane, L. y Skaare, J. (2002). *"Food web magnification of persistent organic pollutants in poikilotherms and homeotherms"*. Environmental Science & Technology 36: 2589-2597.

Horrigan, F. T. y Aldrich, R. W. (2002). *"Coupling between voltage sensor activation, Ca<sup>2+</sup> binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels"*. Journal of General Physiology 120: 267-305.

Huang, H., Rao, Y., Sun, P. y Gong, L. W. (2002). *"Involvement of actin cytoskeleton in modulation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels from rat hippocampal CA1 pyramidal neurons"*. Neuroscience Letters 332: 141-145.

Huber, M., Göbel, A., Joss, A., Hermann, N., Löffler, D., McArdell, C., Ried, A., Siegrist, H., Ternes, T. y von Gunten, U. (2005). *"Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: a pilot study"*. Environmental Science & Technology 39: 4290-4299.

IARC. (1987). *"IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs"*. International Agency for Research on Cancer, Lyon (Francia). 59 pp.

ICCVAM. (2001). *"Guidance document on using in vitro data to estimate in vivo starting doses for acute toxicity"*. No. 01-4500. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), Research Triangle Park, NC. 102 pp.

ICCVAM. (2003). "Guidelines for the nomination and submission of new, revised, and alternative test methods". NIH Publication No 03-4508. National Institute for Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC. 50 pp.

Irigaray, P., Newby, J. A., Clapp, R., Hardell, L., Howard, V., Montagnier, L., Epstein, S. y Belpomme, D. (2007). "Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: An overview". *Biomedicine & Pharmacotherapy* 61: 640-658.

Ishihara, N., Jofuku, A., Eura, Y. y Mihara, K. (2003). "Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301: 891-898.

Ishii, A., Sakai, Y. y Nakamura, A. (2007). "Molecular pathological evaluation of clusterin in a rat model of unilateral ureteral obstruction as a possible biomarker of nephrotoxicity". *Toxicologic Pathology* 35: 376-382.

ISO. (1999). "Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5. Test for Cytotoxicity: In vitro Methods". ISO 10993-5. International Standardization Organization.

Jakab, M., Fürst, J., Gschwenter, M., Bottà, G., Garavaglia, M., Bazzini, C., Rodighiero, S., Meyer, G., Eichmüller, S., Wöll, E., Chwatal, S., Ritter, M. y Paulmichl, M. (2002). "Mechanisms sensing and modulating signals arising from cell swelling". *Cellular Physiology and Biochemistry* 12: 235-258.

Jalava, P., Salonen, R., Pennanen, A., Sillanpää, M., Hälinen, A., Happonen, M., Hillamo, R., Brunekreef, B., Katsouyanni, K., Sunyer, J. y Hirvonen, M. (2007). "Heterogeneities in inflammatory and cytotoxic responses of RAW 264.7 macrophage cell line to urban air coarse, fine, and ultrafine particles from six European sampling campaigns." *Inhalation Toxicology* 19: 213-225.

Jang, Y. J., Ji, J. H., Choi, Y. C., Ryu, C. J. y Ko, S. Y. (2007). "Regulation of polo-like kinase 1 by DNA damage in mitosis - Inhibition of mitotic PLK-1 By protein phosphatase 2A". *The Journal of Biological Chemistry* 282: 2473-2482.

Janjua, N., Mortensen, G., Andersson, A., Kongshoj, B., Skakkebaek, N. y Wulf, H. (2007). "Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans". *Environmental Science & Technology* 41: 5564-5570.

Janjua, N. R., Frederiksen, H., Skakkebaek, N. E., Wulf, H. C. y Andersson, A.-M. (2008). "Urinary excretion of phthalates and paraben after repeated whole-body topical application in humans". *International Journal of Andrology* 31: 118-130.

JECFA. (2007). "Evaluation of certain food additives and contaminants. Sixty-seventh report of the joint FAO/WHO Expert committee on Food Additives". WHO Technical Report Series 940. World Health Organization, Roma (Italia). 104 pp.

Jeong, S., Kim, B., Kang, H., Ku, H. y Cho, J. (2005). "Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats". *Toxicology* 208: 49-62.

Jian, L. y Li Wan Po, A. (1993). "Ciliotoxicity of methyl- and propyl-p-hydroxybenzoates: a dose-response and surface-response study". *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 45: 925-927.

Jjemba, P. (2006). "Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63: 113-130.

Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M. y Sumpter, J. (1995). "A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic". *Environmental Health Perspectives* 103: 582-587.

Jos, A., Repetto, G., Rios, J. C., del Peso, A., Salguero, M., Hazen, M. J., Molero, M. L., Fernandez-Freire, P., Perez-Martin, J. M., Labrador, V. y Camean, A. (2005). "Ecotoxicological evaluation of the additive butylated hydroxyanisole using a battery with six model systems and eighteen endpoints". *Aquatic Toxicology* 71: 183-192.

Jos, A., Repetto, G., Rios, J. C., Hazen, N., Molero, M. L., del Peso, A., Salguero, M., Fernandez-Freire, P., Perez-Martin, J. M. y Camen, A. (2003). *"Ecotoxicological evaluation of carbamazepine using six different model systems with eighteen endpoints"*. Toxicology in Vitro 17: 525-532.

Joss, A., Keller, E., Alder, A. C., Gobel, A., McArdell, C. S., Ternes, T. y Siegrist, H. (2005). *"Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment"*. Water Research 39: 3139-3152.

Jovanovic, S. y Jovanovic, A. (2001). *"Diadenosine tetraphosphate-gating of cardiac K-ATP channels requires intact actin cytoskeleton"*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 364: 276-280.

Kamaraju, K. y Sukharev, S. (2008). *"The membrane lateral pressure-perturbing capacity of parabens and their effects on the mechanosensitive channel directly correlate with hydrophobicity"*. Biochemistry 47: 10540-10550.

Kanaar, R., Wyman, C. y Rothstein, R. (2008). *"Quality control of DNA break metabolism: in the 'end', it's a good thing"*. The EMBO Journal 27: 581-588.

Kanu, N. y Behrens, A. (2007). *"ATMIN defines an NBS1-independent pathway of ATM signalling"*. The EMBO Journal 26: 2933-2941.

Karagiannis, T. C. y El-Osta, A. (2004). *"Double-strand breaks: signaling pathways and repair mechanisms"*. Cellular and Molecular Life Sciences 61: 2137-2147.

Kashanian, S. y Dolatabadi, J. E. N. (2009). *"In vitro study of calf thymus DNA interaction with butylated hydroxyanisole"*. DNA and Cell Biology 28: 535-540.

Kayaselcuk, F., Erkanli, S., Bolat, F., Seydaoglu, G., Kuscu, E. y Demirhan, B. (2006). *"Expression of cyclin H in normal and cancerous endometrium, its correlation with other cyclins, and association with clinicopathologic parameters"*. International Journal of Gynecological Cancer 16: 402-408.

Kelly, C. y Rice, J. (1990). *"Monotone smoothing with application to the dose-response curves and the assessment of synergism"*. Biometrics 46: 1071-1085.

Keston, A. S. y Brandt, R. (1965). *"Fluorimetric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide"*. Analytical Biochemistry 11: 1-5.

Khanna, K. K. y Jackson, S. P. (2001). *"DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection"*. Nature Genetics 27: 247-254.

Klaassen, C. y Watkins III, J. (2001). *"Manual de Toxicología de Casarett y Doull. 5ª Edición."* McGraw Hill (México, DF), 981 pp.

Kling, J. (2006). *"Bundling next-generation cancer therapies for synergy"*. Nature Biotechnology 24: 871-872.

Komissarova, E. V., Saha, S. K. y Rossman, T. G. (2005). *"Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example"*. Toxicology and Applied Pharmacology 202: 99-107.

Kong, A., Owuor, E., Yu, R., Hebbbar, V., Chen, C., Hu, R. y Mandlekar, S. (2001). *"Induction of xenobiotic enzymes by the MAP Kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE)"*. Drug Metabolism Reviews 33: 255-271.

Kortenkamp, A. (2006). *"Breast cancer, oestrogens and environmental pollutants: a re-evaluation from a mixture perspective"*. International Journal of Andrology 29: 193-198.

Kortenkamp, A. (2007). *"Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals"*. Environmental Health Perspectives 115: 98-105.

Kortenkamp, A. y Altenburger, R. (1998). *"Synergisms with mixtures of xenoestrogens: A reevaluation using the method of isoboles"*. Science of the Total Environment 221: 59-73.

Kraft, R., Benndorf, K. y Patt, S. (2000). *"Large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human meningioma cells"*. The Journal of Membrane Biology 175: 25-33.

Krauze, S. y Fitak, B. (1971). "Influence of preservatives on the biosynthesis of nucleic acids on the protein content of animal cells in tissue culture." *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmittel-untersuchung un Hygiene* 62: 359-367.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M. E., Tschoop, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B. y Melino, G. (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009". *Cell Death and Differentiation* 16: 3-11.

Krüger, T., Ghisari, M., Hjelmberg, P., Deutch, B. y Bonefeld-Jorgensen, E. (2008). "Xenohormone transactivities are inversely associated to serum POPs in Inuit". *Environmental Health* 7: 38-52.

Kulkarni, A. y Das, K. (2008). "Differential roles of ATR and ATM in p53, Chk1, and histone H2AX phosphorylation in response to hyperoxia: ATR-dependent ATM activation". *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 294: 998-1006.

Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N. y Mitchell, R. (2008). "Lesión celular, muerte celular y adaptaciones". En: *Robbins, Patología Humana* ELSEVIER Saunders 8ª Edición (Barcelona), pp. 1-32.

Kuo, L. y Yang, L. (2008). "γ-H2AX - A novel biomarker for DNA double-strand breaks". *In vivo* 22: 305-310.

Kurata, S. (2000). "Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress". *The Journal of Biological Chemistry* 275: 23413-23416.

L'Hoste, S., Barriere, H., Belfodil, R., Rubera, I., Duranton, C., Tauc, M., Poujeol, C., Barhanin, J. y Poujeol, P. (2007). "Extracellular pH alkalization by Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger is crucial for TASK2 activation by hypotonic shock in proximal cell lines from mouse kidney". *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 292: F628-F638.

L'Hoste, S., Chargui, A., Belfodil, R., Duranton, C., Rubera, I., Mograbi, B., Poujeol, C., Tauc, M. y Poujeol, P. (2009). "CFTR mediates cadmium-induced apoptosis through modulation of ROS level in mouse proximal tubule cells". *Free Radical Biology & Medicine* 46: 1017-1031.

Labrador, V., Fernández Freire, P., Pérez Martín, J. M. y Hazen, M. J. (2007). "Cytotoxicity of butylated hydroxyanisole in Vero cells". *Cell Biology and Toxicology* 23: 189-199.

Lai, X. G., Yang, J., Zhou, S. S., Zhu, J., Li, G. R. y Wong, T. M. (2004). "Involvement of anion channel(s) in the modulation of the transient outward K<sup>+</sup> channel in rat ventricular myocytes". *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 287: C163-C170.

Lajoie, P., Goetz, J. G., Dennis, J. W. y Nabi, I. R. (2009). "Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane". *The Journal of Cell Biology* 185: 381-385.

Lambert, I. (2003). "Reactive oxygen species regulate swelling-induced taurine efflux in NIH3T3 mouse fibroblasts". *The Journal of Membrane Biology* 192: 19-32.

Lambert, I. H., Hoffmann, E. K. y Pedersen, S. F. (2008). "Cell volume regulation: physiology and pathophysiology". *Acta Physiologica* 194: 255-282.

Lambert, J. C. y Lipscomb, J. C. (2007). "Mode of action as a determining factor in additivity models for chemical mixture risk assessment". *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 49: 183-194.

Lang, F., Vallon, V., Knipper, M. y Wangemann, P. (2007). "Functional significance of channels and transporters expressed in the inner ear and kidney". *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 293: C1187-C1208.

Lee, H., Peart, T. y Svoboda, M. (2005). "Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of Chromatography A* 1094: 122-129.

Leist, M., Hartung, T. y Nicotera, P. (2008). "The dawning of a new age of toxicology". *Alternativen zu Tierexperimenten* 25: 103-114.

- Lieber, M. R. (2008). "The mechanism of human nonhomologous DNA end joining". *The Journal of Biological Chemistry* 283: 1-5.
- Lindahl, T., Landberg, G., Ahlgren, J., Nordgren, H., Norberg, T., Klaar, S., Holmberg, L. y Bergh, J. (2004). "Overexpression of cyclin E protein is associated with specific mutation types in the p53 gene and poor survival in human breast cancer". *Carcinogenesis* 25: 375-380.
- Liu, X. J., Chang, Y. C., Reinhart, P. H. y Sontheimer, H. (2002). "Cloning and characterization of glioma BK, a novel BK channel isoform highly expressed in human glioma cells". *The Journal of Neuroscience* 22: 1840-1849.
- Loewe, S. (1953). "The problem of synergism and antagonism of combined drugs". *Arzneimittel-Forschung* 3: 285-290.
- Loewe, S. y Muischnek, H. (1926). "Über kombinationswirkungen 1. Mitteilung: Hilfsmittel der fragestellung". *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 114: 313-326.
- Lolli, G. y Johnson, L. N. (2005). "CAK-cyclin-dependent activating kinase - A key kinase in cell cycle control and a target for drugs?" *Cell Cycle* 4: 572-577.
- Lu, T., He, T. R., Katusic, Z. S. y Lee, H. C. (2006). "Molecular mechanisms mediating inhibition of human large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels by high glucose". *Circulation Research* 99: 607-616.
- Luo, Y., Hurwitz, J. y Massague, J. (1995). "Cell cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21 (Cip1)". *Nature* 375: 159-161.
- Malumbres, M. y Barbacid, M. (2005). "Mammalian cyclin-dependent kinases". *Trends in Biochemical Sciences* 30: 630-641.
- Malumbres, M. y Barbacid, M. (2009). "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm". *Nature Reviews Cancer* 9: 153-166.
- Manderville, R. (2005). "Ambident reactivity of phenoxyl radicals in DNA adduction". *Canadian Journal of Chemistry* 83: 1261-1267.
- Martin-Skilton, R., Lavado, R., Thibaut, R., Minier, C. y Porte, C. (2006). "Evidence of endocrine alteration in the red mullet, *Mullus barbatus* from the NW Mediterranean". *Environmental Pollution* 141: 60-68.
- Mason, A. M., Borgert, C. J., Bus, J. S., Moiz Mumtaz, M., Simmons, J. E. y Sipes, I. G. (2007). "Improving the scientific foundation for mixtures joint toxicity and risk assessment: Contributions from the SOT mixtures project - Introduction". *Toxicology and Applied Pharmacology* 223: 99-103.
- Mates, J. M., Segura, J. A., Alonso, F. J. y Marquez, J. (2008). "Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis". *Archives of Toxicology* 82: 273-299.
- Matsumoto, Y. y Maller, J. L. (2004). "A centrosomal localization signal in cyclin E required for Cdk2-independent S phase entry". *Science* 306: 885-888.
- McCarty, L. y Borgert, C. (2006). "Review of the toxicity of chemical mixtures: Theory, policy, and regulatory practice". *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 45: 119-143.
- Meadows, S., Gennings, C., Carter, W. J. y Bae, D. (2002). "Experimental designs for mixtures of chemicals along fixed ratio rays". *Environmental Health Perspectives* 110: 979-983.
- Miège, C., Choubert, J., Ribeiro, L., Eusèbe, M. y Coquery, M. (2008). "Removal efficiency of pharmaceuticals and personal care products with varying wastewater treatment processes and operating conditions - conception of a database and first results". *Water Science and Technology* 57: 49-56.
- Millot, C., Millot, J., Morjani, H., Desplaces, A. y Manfait, M. (1997). "Characterization of acidic vesicles in multidrug-resistant and sensitive cancer cells by acridine orange staining and confocal microspectrofluorimetry". *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 45: 1255-1264.



- Monks, T. J., Xie, R. Y., Tikoo, K. y Lau, S. S. (2006). "ROS-induced histone modifications and their role in cell survival and cell death". *Drug Metabolism Reviews* 38: 755-767.
- Monosson, E. (2005). "Chemical Mixtures: Considering the evolution of Toxicology and Chemical Assessment". *Environmental Health Perspectives* 113: 383-390.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- Mumtaz, M. y Durkin, P. (1992). "A weight-of-evidence approach for assessing interactions in chemical mixtures". *Toxicology and Industrial Health* 8: 377-406.
- Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species". *The Biochemical Journal* 417: 1-13.
- Murray-Zmijewski, F., Slee, E. A. y Lu, X. (2008). "A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 702-712.
- Nakagawa, Y. y Moldéus, P. (1998). "Mechanisms of p-hydroxybenzoate ester-induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes". *Biochemical Pharmacology* 55: 1907-1914.
- Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Matsumoto, M., Nakamichi, I., Kitagawa, K., Shirane, M., Tsunematsu, R., Tsukiyama, T., Ishida, N., Kitagawa, M. y Hatakeyama, S. (2000). "Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27 (Kip1), polyploidy and centrosome overduplication". *The EMBO Journal* 19: 2069-2081.
- Nardi, A. y Olesen, S. P. (2008). "BK channel modulators: A comprehensive overview". *Current Medicinal Chemistry* 15: 1126-1146.
- NAS. (1994). "Science and Policy in Risk Assessment. National Advances and Opportunities". National Academy of Sciences, Washington, DC.
- Nera, E., Lok, E., Iverson, F., Ormsby, E., Karpinski, K. y Clayson, D. (1984). "Short-term pathological and proliferative effects of butylated hydroxyanisole and other phenolic antioxidants in the forestomach of Fischer 344 rats". *Toxicology* 32: 197-213.
- Nghiem, L., Schafer, A. y Elimelech, M. (2005). "Pharmaceutical retention mechanisms by nanofiltration membranes". *Environmental Science & Technology* 39: 7698-7705.
- Nguyen, T., Clare, B., Guo, W. y Martinac, B. (2005). "The effects of parabens on the mechanosensitive channels of *E. coli*". *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 34: 389-395.
- NIEHS. (1991). "Sixth Annual Report on Carcinogens (1991)". U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. (Rockville), 2 pp.
- Nilius, B. y Droogmans, G. (2003). "Amazing chloride channels: an overview". *Acta Physiologica Scandinavica* 177: 119-147.
- Nishizawa, C., Takeshita, K., Ueda, J.-i., Nakanishi, I., Suzuki, K. T. y Ozawa, T. (2006). "Reaction of para-hydroxybenzoic acid esters with singlet oxygen in the presence of glutathione produces glutathione conjugates of hydroquinone, potent inducers of oxidative stress". *Free Radical Research* 40: 233-240.
- Nyberg, K. A., Michelson, R. J., Putnam, C. W. y Weinert, T. A. (2002). "Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints". *Annual Review of Genetics* 36: 617-656.
- O'Malley, D., Irving, A. J. y Harvey, J. (2005). "Leptin-induced dynamic changes in the actin cytoskeleton mediate the activation and synaptic clustering of BK channels". *The FASEB Journal* 19: 1917-1919.
- OCDE. (1998). "Report on the OCDE workshop on statistical analysis of aquatic toxicology data". *Series on Testing and Assessment*. ENV/MC/CHEM(98)18. OCDE, París. 133 pp.
- OCDE. (2003). "Draft guidance document for on the statistical analysis of ecotoxicology data". *Series on Testing and Assessment*. OCDE, París. 214 pp.

- Ohnishi, T., Takahashi, A., Nagamatsu, A., Omori, K., Suzuki, H., Shimazu, T. y Ishioka, N. (2009). "Detection of space radiation-induced double strand breaks as a track in cell nucleus". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390: 485-488.
- Okada, Y., Maeno, E., Shimizu, T., Dezaki, K., Wang, J. y Morishima, S. (2001). "Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD)". *Journal of Physiology* 532: 3-16.
- Okubo, T., Yokoyama, Y., Kano, K. y Kano, I. (2004). "Molecular mechanism of cell death induced by the antioxidant tert-butylhydroxyanisole in human monocytic leukemia U937 cells". *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27: 295-302.
- Olsnes, S., Ludt, J., Tonnessen, T. I. y Sandvig, K. (1987). "Bicarbonate chloride antiport in *vero* cells. 2. Mechanisms for bicarbonate-dependent regulation of intracellular pH". *Journal of Cellular Physiology* 132: 192-202.
- Orio, P., Rojas, P., Ferreira, G. y Latorre, R. (2002). "New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits". *News in Physiological Sciences* 17: 156-161.
- Osman, A. y van Noort, P. (2007). "Comparison of key enzymes in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, the earthworm *Allolobophora chlorotica* and *Chironomus riparius* larvae". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67: 212-217.
- Panicker, L. (2008). "Interaction of propyl paraben with dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer: A differential scanning calorimetry and nuclear magnetic resonance study". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 61: 145-152.
- Parat, M. O. (2009). "The biology of caveolae: achievements and perspectives". *International Review of Cell and Molecular Biology* 273: 117-162.
- Parton, R. G. y Simons, K. (2007). "The multiple faces of caveolae". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8: 185-194.
- Pasantes-Morales, H., Lezama, R. A. y Ramos-Mandujano, G. (2006). "Tyrosine kinases and osmolyte fluxes during hyposmotic swelling". *Acta Physiologica* 187: 93-102.
- Pasantes-Morales, H. y Mulia, S. M. (2000). "Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels". *Nephron* 86: 414-427.
- Patel, H. H. y Insel, P. A. (2009). "Lipid rafts and caveolae and their role in compartmentation of redox signaling". *Antioxidants & Redox Signaling* 11: 1357-1372.
- Patel, H. H., Murray, F. y Insel, P. A. (2008). "G-protein-coupled receptor-signaling components in membrane raft and caveolae microdomains". *Handbook of experimental pharmacology* 186: 167-184.
- Payton, M. y Coats, S. (2002). "Cyclin E2, the cycle continues". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34: 315-320.
- Pedersen, S. F., Hoffmann, E. K. y Mills, J. W. (2001). "The cytoskeleton and cell volume regulation". *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A Molecular & Integrative Physiology* 130: 385-399.
- Pérez Martín, J. M., Fernández Freire, P., Labrador, V. y Hazen, M. J. (2008). "Carbamazepine induces mitotic arrest in mammalian Vero cells". *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 637: 124-133.
- Peterson, J. J. y Novick, S. J. (2007). "Nonlinear blending: A useful general concept for the assessment of combination drug synergy". *Journal of Receptors and Signal Transduction* 27: 125-146.
- Phillips, B. J., Carroll, P. A., Tee, A. C. y Anderson, D. (1989). "Microsome-mediated clastogenicity of butylated hydroxyanisole (BHA) in cultured chinese-hamster ovary cells. The possible role of reactive oxygen species". *Mutation Research* 214: 105-114.
- Pietenpol, J. y Stewart, Z. (2002). "Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis". *Toxicology* 181-182: 475-481.

- Pluznick, J. L. y Sansom, S. C. (2006). *"BK channels in the kidney: role in K<sup>+</sup> secretion and localization of molecular components"*. American Journal of Physiology. Renal Physiology 291: F517-F529.
- Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F. y Chiarpotto, E. (2004). *"Oxidative stress and cell signalling"*. Current Medicinal Chemistry 11: 1163-1182.
- Pomati, F., Castiglioni, S., Zuccato, E., Fanelli, R., Vigetti, D., Rossetti, C. y Calamari, D. (2006). *"Effects of a complex mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells"*. Environmental Science & Technology S40: 28-34.
- Pomati, F., Orlandi, C., Clerici, M., Luciani, F. y Zuccato, E. (2008). *"Effects and interactions in an environmentally relevant mixture of pharmaceuticals"*. Toxicological Sciences 102: 129-137.
- Prichard, M. N. y Shipman, C. (1990). *"A 3-Dimensional model to analyze drug-drug interactions"*. Antiviral Research 14: 181-206.
- Pugazhendhi, D., Pope, G. y Darbre, P. (2005). *"Oestrogenic activity of p-hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and methylparaben in human breast cancer cell lines."* Journal of Applied Toxicology 25: 301-309.
- Quintela, M., Barreiro, R. y Ruiz, J. M. (2002). *"Dumpton Syndrome reduces the tributyltin (TBT) sterilising effect on Nucella lapillus (L.) by limiting the development of the imposed vas deferens"*. Marine Environmental Research 54: 657-660.
- Raab, U., Preiss, U., Albrecht, M., Shahin, N., Parlar, H. y Fromme, H. (2008). *"Concentrations of polybrominated diphenyl ethers, organochlorine compounds and nitro musks in mother's milk from Germany (Bavaria)"*. Chemosphere 72: 87-94.
- Raab, U., Schwegler, U., Preiss, U., Albrecht, M. y Fromme, H. (2007). *"Bavarian breast milk survey - Pilot study and future developments"*. International Journal of Hygiene and Environmental Health 210: 341-344.
- Ranney, M. K., Ahmed, I. S. A., Potts, K. R. y Craven, R. J. (2007). *"Multiple pathways regulating the anti-apoptotic protein clusterin in breast cancer"*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease 1772: 1103-1111.
- Rastogi, S., Schouten, A., de Kruijf, N. y Weijland, J. (1995). *"Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products"*. Contact Dermatitis 32: 28-30.
- Ree, A. H., Bratland, A., Nome, R. V., Stokke, T. y Fodstad, O. (2003). *"Repression of mRNA for the PLK cell cycle gene after DNA damage requires BRCA1"*. Oncogene 22: 8952-8955.
- Reed, S. I. (2006). *"The ubiquitin-proteasome pathway in cell cycle control"*. Results and Problems in Cell Differentiation 42: 147-181.
- Repetto, G., del Peso, A., Sanz, P. y Repetto, M. (2001). *"In vitro effects of lithium and nickel at different levels on Neuro-2a mouse Neuroblastoma cells"*. Toxicology in Vitro 15: 363-368.
- Repetto, M., Sanz, P., Jurado, C., López-Artíguez, M., Menéndez, M. y de la Peña, E. (1995). *"Glosario de términos toxicológicos"*. Asociación Española de Toxicología (Sevilla), 100 pp.
- Rice, G., MacDonell, M., Hertzberg, R. C., Teuschler, L., Picel, K., Butler, J., Chang, Y.-S. y Hartmann, H. (2008). *"An approach for assessing human exposures to chemical mixtures in the environment"*. Toxicology and Applied Pharmacology 233: 126-136.
- Rich, T., Allen, R. L. y Wyllie, A. H. (2000). *"Defying death after DNA damage"*. Nature 407: 777-783.
- Rizzi, F. y Bettuzzi, S. (2010). *"The clusterin paradigm in prostate and breast carcinogenesis"*. Endocrine-Related Cancer 17: R1-R17.
- Rodella, L., Ricci, F., Borsani, E., Stacchiotti, A., Foglio, E., Favero, G., Rezzani, R., Mariani, C. y Bianchi, R. (2008). *"Aluminium exposure induces Alzheimer's disease-like histopathological alterations in mouse brain"*. Histology and Histopathology 23: 433-439.

- Rodrigues, C., Lok, E., Nera, E., Iverson, F., Page, D., karpinski, K. y Clayson, D. (1986). *"Short-term effects of various phenols and acids on the Fischer 344 male rat forestomach epithelium"*. Toxicology 38: 103-117.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. y Bonner, W. M. (1998). *"DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139"*. The Journal of Biological Chemistry 273: 5858-5868.
- Rogiers, V. (2005). *"Recent developments in the way forward for alternative methods: Formation of national consensus platforms in Europe"*. Toxicology and Applied Pharmacology 207: 408-413.
- Rojas-Rivera, D., Diaz-Elizondo, J., Parra, V., Salas, D., Contreras, A., Toro, B., Chiong, M., Olea-Azar, C. y Lavandero, S. (2009). *"Regulatory volume decrease in cardiomyocytes is modulated by calcium influx and reactive oxygen species"*. FEBS Letters 583: 3485-3492.
- Romero, D., Gómez - Zapata, M., Luna, A. y García - Fernández, A. J. (2004). *"Morphological characterization of renal cell lines (BGM and VERO) exposed to low doses of lead nitrate"*. Histology and Histopathology 19: 69-79.
- Rousseau, D., Cannella, D., Boulaire, J., Fitzgerald, P., Fotedar, A. y Fotedar, R. (1999). *"Growth inhibition by CDK-cyclin and PCNA binding domains of p21 occurs by distinct mechanisms and is regulated by ubiquitin-proteasome pathway"*. Oncogene 18: 4313-4325.
- Sado, I. (1973). *"Synergistic toxicity of official permissible preservative food additives"*. Nippon eiseigaku zasshi/Japanese Journal of Hygiene 28: 463-476.
- Saito, M., Sakagami, H. y Fujisawa, S. (2003). *"Cytotoxicity and apoptosis induction by butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT)"*. Anticancer Research 23: 4693-4702.
- Sarafian, T. A., Kouyoumjian, S., Tashkin, D. y Roth, M. D. (2002). *"Synergistic cytotoxicity of Delta(9)-tetrahydrocannabinol and butylated hydroxyanisole"*. Toxicology Letters 133: 171-179.
- Sardini, A., Amey, J. S., Weylandt, K. H., Nobles, M., Valverde, M. A. y Higgins, C. F. (2003). *"Cell volume regulation and swelling-activated chloride channels"*. Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes 1618: 153-162.
- Sasaki, F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohsita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K. y Tsuda, S. (2002). *"The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives"*. Mutation Research 519: 103-119.
- Satoh, K., Atsumi, T., Sakagami, H., Kashiwagi, Y., Ida, Y., Ueha, T., Sugita, Y., Yokoe, I. y Fujisawa, S. (1999). *"Radical intensity and cytotoxicity of butylated hydroxyanisole and its orthobisphenol dimer"*. Anticancer Research 17: 3947-3952.
- Schilderman, P., Rhijnsburger, E., Zwingmann, I. y Kleinjans, J. C. S. (1995). *"Induction of oxidative DNA-damage and enhancement of cell-proliferation in human-lymphocytes in vitro by butylated hydroxyanisole"*. Carcinogenesis 16: 507-512.
- Schliess, F., Reinehr, R. y Haussinger, D. (2007). *"Osmosensing and signaling in the regulation of mammalian cell function"*. FEBS Journal 274: 5799-5803.
- Schliess, F., Reissmann, R., Reinehr, R., vom Dahl, S. y Haussinger, D. (2004). *"Involvement of integrins and Src in insulin signaling toward autophagic proteolysis in rat liver"*. The Journal of Biological Chemistry 279: 21294-21301.
- Schwarzenbach, R. P., Escher, B. I., Fenner, K., Hofstetter, T. B., Johnson, C. A., von Gunten, U. y Wehrli, B. (2006). *"The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems"*. Science 313: 1072-1077.
- Seoane, J., Le, H. V. y Massague, J. (2002). *"Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage"*. Nature 419: 729-734.
- Setzer, R. y Kimmel, C. (2003). *"Use of NOAEL, benchmark dose, and other models for human risk assessment of hormonally active substances"*. Pure and Applied Chemistry 75: 2151-2158.

- Shannan, B., Seifert, M., Boothman, D. A., Tilgen, W. y Reichrath, J. (2006). "Clusterin and DNA repair: a new function in cancer for a key player in apoptosis and cell cycle control". *Journal of Molecular Histology* 37: 183-188.
- Shen, H., Jiang, H., Mao, H., Pan, G., Zhou, L. y Cao, Y. (2007). "Simultaneous determination of seven phthalates and four parabens in cosmetic products using HPLC-DAD and GC-MS methods". *Journal of Separation Science* 30: 48-54.
- Sheu, C. W., Salomon, D., Simmons, J. L., Sreevalsan, T. y Freese, E. (1975). "Inhibitory effects of lipophilic acids and related compounds on bacteria and mammalian-cells". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 7: 349-363.
- Shiloh, Y. (2003). "ATM and related protein kinases: Safeguarding genome integrity". *Nature Reviews Cancer* 3: 155-168.
- Shimokawa, H. y Matoba, T. (2004). "Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor". *Pharmacological Research* 49: 543-549.
- Shvedova, A. A., Kommineni, C., Jeffries, B. A., Castranova, V., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Serbinova, E. A., Fabisiak, J. P. y Kagan, V. E. (2000). "Redox cycling of phenol induces oxidative stress in human epidermal keratinocytes". *The Journal of Investigative Dermatology* 114: 354-364.
- Silva, E., Rajapakse, N. y Kortenkamp, A. (2002). "Something from 'nothing' - eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects." *Environmental Science & Technology* 36: 1751-1756.
- Simmons, J., Richardson, S., Speth, T., Miltner, R., Rice, G., Schenck, K., Hunter 3rd, E. y Teuschler, L. (2002). "Development of a research strategy for integrated technology-based toxicological and chemical evaluation of complex mixtures of drinking water disinfection byproducts". *Environmental Health Perspectives* 110: 1013-1024.
- Simonetti, G., Simonetti, N. y Villa, A. (2003). "Increase of activity of tioconazole against resistant microorganisms by the addition of butylated hydroxyanisole". *International Journal of Antimicrobial Agents* 22: 439-443.
- Simonetti, G., Simonetti, N. y Villa, A. (2004). "Increased microbicidal activity of green tea (*Camellia sinensis*) in combination with butylated hydroxyanisole." *Journal of Chemotherapy* 16: 122-127.
- Sionov, R. V. y Haupt, Y. (1999). "The cellular response to p53: the decision between life and death". *Oncogene* 18: 6145-6157.
- Skulachev, V. P. (2001). "Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables". *Trends in Biochemical Sciences* 26: 23-29.
- Slamenová, D., Horvathová, E., Robichová, S., Hrusovská, L., Gabelová, A., Kleibl, K., Jakubiková, J. y Sedlak, J. (2003). "Molecular and cellular influences of butylated hydroxyanisole on Chinese hamster V79 cells treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: antimutagenicity of butylated hydroxyanisole." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 41: 28-36.
- Solé, M., Raldua, D., Barceló, D. y Porte, C. (2003). "Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones, and biotransformation enzymes in female carp in relation to a sewage treatment works". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56: 373-380.
- Soni, M., Burdock, G., Taylor, S. y Greenberg, N. (2001). "Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature". *Food and Chemical Toxicology* 39: 513-532.
- Soni, M., Carabin, I. y Burdock, G. (2005). "Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens)". *Food and Chemical Toxicology* 43: 985-1015.
- Sonnenbichler, J., Scalera, F., Sonnenbichler, I. y Weyhenmeyer, R. (1999). "Stimulatory effects of silibinin and silicristin from the milk thistle *Silybum marianum* on kidney cells". *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 390: 1375-1383.

Sonoda, E., Hocheegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y. y Takeda, S. (2006). "Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair". *DNA Repair* 5: 1021-1029.

Soto, M. A., Gonzalez, C., Lissi, E., Vergara, C. y Latorre, R. (2002). "Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel inhibition by reactive oxygen species". *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 282: C461-C471.

Spielmann, H., Genschow, E., Liebsch, M. y Halle, W. (1999). "Determination of the starting dose for acute oral toxicity (LD50) testing of up and down procedure (UDP) from cytotoxicity data". *Alternatives to Laboratory Animals* 27: 957-966.

Spina, D. (2007). "Statistics in Pharmacology". *British Journal of Pharmacology* 152: 291-293.

Spinsanti, G., Panti, C., Lazzeri, E., Marsili, L., Casini, S., Frati, F. y Fossi, M. C. (2006). "Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) skin biopsies". *BMC Molecular Biology* 7: 32-42.

Spruck, C. H., Won, K. A. y Reed, S. I. (1999). "Deregulated cyclin E induces chromosome instability". *Nature* 401: 297-300.

Standley, L., Rudel, R., Swartz, C., Attfield, K., Christian, J., Erickson, M. y Brody, J. (2008). "Wastewater-contaminated groundwater as a source of endogenous hormones and pharmaceuticals to surface water ecosystems". *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC* 27: 2457-2468.

Stierum, R., Conesa, A., Heijne, W., Ommen, B. v., Junker, K., Scott, M. P., Price, R. J., Meredith, C., Lake, B. G. y Groten, J. (2008). "Transcriptome analysis provides new insights into liver changes induced in the rat upon dietary administration of the food additives butylated hydroxytoluene, curcumin, propyl gallate and thiabendazole". *Food and Chemical Toxicology* 46: 2616-2628.

Stierum, R., Heijne, W., Kienhuis, A., van Ommen, B. y Groten, J. (2005). "Toxicogenomics concepts and applications to study hepatic effects of food additives and chemicals". *Toxicology and Applied Pharmacology* 207: 179-188.

Storchova, Z. y Pellman, D. (2004). "From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 45-55.

Strebhardt, K. y Ullrich, A. (2006). "Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy". *Nature Reviews Cancer* 6: 321-330.

Stubbs, C. D. y Smith, A. D. (1984). "The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty-acid composition in relation to membrane fluidity and function". *Biochimica et Biophysica Acta* 779: 89-137.

Stutzin, A. y Hoffmann, E. K. (2006). "Swelling-activated ion channels: functional regulation in cell-swelling, proliferation and apoptosis". *Acta Physiologica* 187: 27-42.

Sühnel, J. (1990). "Evaluation of synergism or antagonism for the combined action of antiviral agents". *Antiviral Research* 13: 23-40.

Sühnel, J. (1996). "Zero interaction response surfaces for combined-action assessment". *Food and Chemical Toxicology* 34: 1151-1153.

Sühnel, J. (1998). "Parallel Dose-Response Curves in Combination Experiments". *Bulletin of Mathematical Biology* 60: 197-213.

Sunyer, J., Jarvis, D., Gotschi, T., Garcia-Esteban, R., Jacquemin, B., Aguilera, I., Ackerman, U., de Marco, R., Forsberg, B., Gislason, T., Heinrich, J., Norback, D., Villani, S. y Kunzli, N. (2006). "Chronic bronchitis and urban air pollution in an international study". *Occupational & Environmental Medicine* 63: 836-843.

Suryadinata, R., Sadowski, M. y Sarcevic, B. (2010). "Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates". *Bioscience Reports* 30: 243-255.

- Syljuasen, R. G. (2007). "Checkpoint adaptation in human cells". *Oncogene* 26: 5833-5839.
- Syljuasen, R. G., Jensen, S., Bartek, J. y Lukas, J. (2006). "Adaptation to the ionizing radiation-induced G(2) checkpoint occurs in human cells and depends on checkpoint kinase 1 and Polo-like kinase 1 kinases". *Cancer Research* 66: 10253-10257.
- Tanaka, T., Halicka, H., Huang, X., Traganos, F. y Darzynkiewicz, Z. (2006). "Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of damage by endogenous oxidants". *Cell Cycle* 5: 1940-1945.
- Tang, X. D., Daggett, H., Hanner, M., Garcia, M. L., McManus, O. B., Brot, N., Weissbach, H., Heinemann, S. H. y Hoshi, T. (2001). "Oxidative regulation of large conductance calcium-activated potassium channels". *Journal of General Physiology* 117: 253-273.
- Tang, X. D., Garcia, M. L., Heinemann, S. H. y Hoshi, T. (2004). "Reactive oxygen species impair Slo1 BK channel function by altering cysteine-mediated calcium sensing". *Nature Structural & Molecular Biology* 11: 171-178.
- Tao, G. Z., Rott, L. S., Lowe, A. W. y Omary, M. B. (2002). "Hyposmotic stress induces cell growth arrest via proteasome activation and cyclin/cyclin-dependent kinase degradation". *The Journal of Biological Chemistry* 277: 19295-19303.
- Tavares, R., Martins, F., Oliveira, P., Ramalho-Santos, J. y Peixoto, F. (2009). "Parabens in male infertility-is there a mitochondrial connection?" *Reproductive Toxicology* 27: 1-7.
- Tayama, S., Nakagawa, Y. y Tayama, K. (2008). "Genotoxic effects of environmental estrogen-like compounds in CHO-K1 cells". *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 649: 114-125.
- Temple, M. D., Perrone, G. G. y Dawes, I. W. (2005). "Complex cellular responses to reactive oxygen species". *Trends in Cell Biology* 15: 319-326.
- Terasaka, S., Inoue, A., Tanji, M. y Kiyama, R. (2006). "Expression profiling of estrogen-responsive genes in breast cancer cells treated with alkylphenols, chlorinated phenols, parabens, or bis- and benzoylphenols for evaluation of estrogenic activity". *Toxicology Letters* 163: 130-141.
- Ternes, T. (1998). "Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers". *Water Research* 32: 3245-3260.
- Teuschler, L. K. (2007). "Deciding which chemical mixtures risk assessment methods work best for what mixtures". *Toxicology and Applied Pharmacology* 223: 139-147.
- Thengchaisri, N. y Kuo, L. (2003). "Hydrogen peroxide induces endothelium-dependent and -independent coronary arteriolar dilation: role of cyclooxygenase and potassium channels". *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 285: H2255-H2263.
- Thomas, C. M. y Smart, E. J. (2008). "Caveolae structure and function". *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12: 796-809.
- Thomas, K. y Hilton, M. (2004). "The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries". *Marine Pollution Bulletin* 49: 436-444.
- Thukral, S. K., Nordone, P. J., Hu, R., Sullivan, L., Galambos, E., Fitzpatrick, V. D., Healy, L., Bass, M. B., Cosenza, M. E. y Afshari, C. A. (2005). "Prediction of nephrotoxicant action and identification of candidate toxicity-related biomarkers". *Toxicologic Pathology* 33: 343-355.
- Tian, L., McClafferty, H., Chen, L. y Shipston, M. J. (2008). "Reversible tyrosine protein phosphorylation regulates large conductance voltage- and calcium-activated potassium channels via cortactin". *The Journal of Biological Chemistry* 283: 3067-3076.
- Tian, L. J., Hammond, M. S. L., Florance, H., Antoni, F. A. y Shipston, M. J. (2001). "Alternative splicing determines sensitivity of murine calcium-activated potassium channels to glucocorticoids". *Journal of Physiology* 537: 57-68.

- Toyokuni, S., Tanaka, T., Hattori, Y., Nishiyama, Y., Ochi, H., Hiai, H., Uchida, K. y Osawa, T. (1997). "Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model". *Laboratory Investigation* 76: 365-374.
- Trouet, D., Nilius, B., Jacobs, A., Remacle, C., Droogmans, G. y Eggermont, J. (1999). "Caveolin-1 modulates the activity of the volume-regulated chloride channel". *Journal of Physiology* 520: 113-119.
- Trougakos, I. P. y Gonos, E. S. (2002). "Clusterin/Apolipoprotein J in human aging and cancer". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34: 1430-1448.
- Trougakos, I. P. y Gonos, E. S. (2006). "Regulation of clusterin/apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in ageing and age-related diseases". *Free Radical Research* 40: 1324-1334.
- Tsuda, H., Sakata, T., Masui, T., Imaida, K. y Ito, N. (1984). "Modifying effects of butylated hydroxyanisole, ethoxyquin and acetaminophen on induction of neoplastic lesions in rat-liver and kidney initiated by N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine". *Carcinogenesis* 5: 525-531.
- Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species". *Journal of Physiology* 552: 335-344.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T. y Fiotakis, C. (2009). "8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis". *Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews* 27: 120-139.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M. y Telser, J. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. y Mazur, M. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer". *Chemico-Biological Interactions* 160: 1-40.
- van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H. J. y Kanaar, R. (2001). "Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection". *Nature Reviews Genetics* 2: 196-206.
- Van Oostdam, J. C., Dewailly, E., Gilman, A., Hansen, J. C., Odland, J. O., Chashchin, V., Berner, J., Butler-Walker, J., Lagerkvist, B. J., Olafsdottir, K., Soininen, L., Bjerregard, P., Klopov, V. y Weber, J. P. (2004). "Circumpolar maternal blood contaminant survey, 1994-1997 organochlorine compounds". *Science of the Total Environment* 330: 55-70.
- van Vugt, M., Bras, A. y Medema, R. H. (2005). "Restarting the cell cycle when the checkpoint comes to a halt". *Cancer Research* 65: 7037-7040.
- Varela, C. A., Baez, M. E. y Agosin, E. (2004). "Osmotic stress response: Quantification of cell maintenance and metabolic fluxes in a lysine-overproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*". *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4222-4229.
- Verhagen, H., Schilderman, P. A. y Kleinjans, J. C. (1991). "Butylated hydroxyanisole in perspective". *Chemico-Biological Interactions* 80: 109-134.
- Wagner, C. A. (2010). "New roles for renal potassium channels". *Journal of Nephrology* 23: 5-8.
- Waldman, T., Lengauer, C., Kinzler, K. y Vogelstein, B. (1996). "Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21". *Nature* 381: 713-716.
- Waldman, T., Zhang, Y. G., Dillehay, L., Yu, J., Kinzler, K., Vogelstein, B. y Williams, J. (1997). "Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy". *Nature Medicine* 3: 1034-1036.
- Walum, E. (1998). "Acute oral toxicity". *Environmental Health Perspectives* 106: 497-503.
- Wang, H. y Joseph, J. (1999). "Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader". *Free Radical Biology & Medicine* 27: 612-616.



- Wang, L. G. y Sigworth, F. J. (2009). "Structure of the BK potassium channel in a lipid membrane from electron cryomicroscopy". *Nature* 461: 292-295.
- Wang, R. Y. y Needham, L. L. (2007). "Environmental Chemicals: From the Environment to Food, to Breast Milk, to the Infant". *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 10: 597-609.
- Waring, J. F. y Halbert, D. N. (2002). "The promise of toxicogenomics". *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 4: 229-235.
- Warth, R., Barriere, H., Meneton, P., Bloch, M., Thomas, J., Tauc, M., Heitzmann, D., Romeo, E., Verrey, F. O., Mengual, R., Guy, N., Bendahhou, S., Lesage, F., Poujeol, P. y Barhanin, J. (2004). "Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K<sup>+</sup> channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 8215-8220.
- Watanabe, H., Pan, Z. Q., Schreiber-Agus, N., DePinho, R. A., Hurwitz, J. y Xiong, Y. (1998). "Suppression of cell transformation by the cyclin-dependent kinase inhibitor p57(KIP2) requires binding to proliferating cell nuclear antigen". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 1392-1397.
- Wehner, F., Olsen, H., Tinel, H., Kinne-Saffran, E. y Kinne, R. K. H. (2003). "Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction". *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 148: 1-80.
- Weisskopf, M., Anderson, H., Hanrahan, L. y Consortium, G. L. (2003). "Decreased sex ratio following maternal exposure to polychlorinated biphenyls from contaminated Great Lakes sport-caught fish: a retrospective cohort study". *Environmental Health: A global Access Science Source* 12: 2-15.
- Whysner, J. y Williams, G. M. (1996). "Butylated hydroxyanisole mechanistic data and risk assessment: Conditional species-specific cytotoxicity, enhanced cell proliferation, and tumor promotion". *Pharmacology & Therapeutics* 71: 137-151.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. y Johnson, G. L. (1999). "Mitogen-activated protein kinase: Conservation of a three-kinase module from yeast to human". *Physiological Reviews* 79: 143-180.
- Wiig, O., Derocher, A. E., Cronin, M. M. y Skaare, J. U. (1998). "Female pseudohermaphrodite polar bears at Svalbard". *Journal of Wildlife Diseases* 34: 792-796.
- Wilson, M. R. y Easterbrook-Smith, S. B. (2000). "Clusterin is a secreted mammalian chaperone". *Trends in Biochemical Sciences* 25: 95-98.
- Williams, G. M. y Iatropoulos, M. J. (1996). "Inhibition of the hepatocarcinogenicity of aflatoxin B-1 in rats by low levels of the phenolic antioxidants butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene". *Cancer Letters* 104: 49-53.
- Williams, G. M., Iatropoulos, M. J. y Whysner, J. (1999). "Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives". *Food and Chemical Toxicology* 37: 1027-1038.
- Wu, J., Basha, M. R., Brock, B., Cox, D. P., Cardozo-Pelaez, F., McPherson, C. A., Harry, J., Rice, D. C., Maloney, B., Chen, D., Lahiri, D. K. y Zawia, N. H. (2008). "Alzheimer's Disease (AD)-Like Pathology in Aged Monkeys after Infantile Exposure to Environmental Metal Lead (Pb): Evidence for a Developmental Origin and Environmental Link for AD". *The Journal of Neuroscience* 28: 3-9.
- Yang, R. S. H. y Dennison, J. (2007). "Initial analyses of the relationship between "Thresholds" of toxicity for individual chemicals and "Interaction Thresholds" for chemical mixtures". *Toxicology and Applied Pharmacology* 223: 133-138.
- Yang, X. M., Li, H. C., Zhou, Z. N., Wang, W. H., Deng, A. P., Andrisani, O. y Liu, X. Q. (2009). "Plk1-mediated Phosphorylation of Topors Regulates p53 Stability". *The Journal of Biological Chemistry* 284: 18588-18592.

Yarborough, A., Zhang, Y.-J., Hsu, T.-M. y Santella, R. M. (1996). "*Immunoperoxidase detection of 8-hydroxydeoxyguanosine in aflatoxin B1-treated rat liver and human oral mucosal cells*". Cancer Research 56: 683-688.

Yasumura, Y. y Kawakita, Y. (1963). "*Studies on SV40 in tissue culture - Preliminary step for cancer research in vitro*". Nippon Rinsho 21: 1209.

Yim, H. S. y Erikson, R. L. (2009). "*Polo-Like Kinase 1 Depletion Induces DNA Damage in Early S Prior to Caspase Activation*". Molecular and Cellular Biology 29: 2609-2621.

Yu, R., Tan, T. y Kong, A. (1997). "*Butylated hydroxyanisole and its metabolite ter-Butylhydroquinone differentially regulate mitogen-activated protein kinases. The role of oxidative stress in the activation of mitogen-activated protein kinases by phenolic antioxidants*". The Journal of Biological Chemistry 272: 28962-28970.

Zeng, X. H., Xia, X. M. y Lingle, C. J. (2003). "*Redox-sensitive extracellular gates formed by auxiliary beta subunits of calcium-activated potassium channels*". Nature Structural Biology 10: 448-454.

Zhang, G. P. y Horrigan, F. T. (2005). "*Cysteine modification alters voltage- and  $Ca^{2+}$ -dependent gating of large conductance (BK) potassium channels*". Journal of General Physiology 125: 213-236.

Zuccato, E., Castiglioni, S. y Fanelli, R. (2005). "*Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment*". Journal of Hazardous Materials 122: 205-209.

Zucco, F., De Angelis, I., Testai, E. y Stammati, A. (2004). "*Toxicology investigation with cell culture system: 20 years after*". Toxicology in Vitro 18: 153-163.

